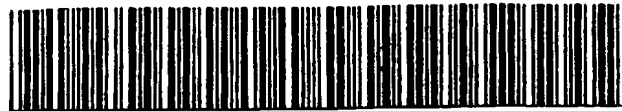


PCT
WELTORGANISATION
INTERNATIONALE ANMELDUNG VEREINIGTER
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



WO 9604017A1

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :

A61K 49/00, 47/48

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 96/04017**

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

15. Februar 1996 (15.02.96)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/00924

(22) Internationales Anmeldedatum: 10. Juli 1995 (10.07.95)

(30) Prioritätsdaten:
P 44 28 851.4 4. August 1994 (04.08.94) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRESSE, Mayk [DE/DE]; Joachim-Friedrich-Strasse 1, D-10711 Berlin (DE). PFEFFERER, Detlev [DE/DE]; Jörsstrasse 7, D-13505 Berlin (DE). LAWACZEK, Rüdiger [DE/DE]; Beyschlagstrasse 8c, D-13503 Berlin (DE). WAGNER, Susanne [DE/DE]; Winterfeldstrasse 83, D-10781 Berlin (DE). EBERT, Wolfgang [DE/DE]; Hortensienstrasse 64, D-12203 Berlin (DE). ELSTE, Volker [DE/DE]; Rykestrasse 40, D-10405 Berlin (DE). SEMMLER, Wolfhard [DE/DE]; Rosa-Luxemburg-Strasse 16, D-16548 Glienicke (DE). TAUPITZ, Matthias [DE/DE]; Winterfeldstrasse 83, D-10781 Berlin (DE). GAIDA, Josef [DE/DE]; Hochstädter Strasse 6, D-13347 Berlin (DE). HERRMANN, Anja [DE/DE]; An der Kappe

69b, D-13583 Berlin (DE). JUKL, Monika [DE/DE]; Hortensienstrasse 64, D-12203 Berlin (DE). SWIDERSKI, Udo [DE/DE]; Mainzer Strasse 20, D-12053 Berlin (DE).

(74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

BEST AVAILABLE COPY

(54) Title: IRON-CONTAINING NANOPARTICLES WITH DOUBLE COATING AND THEIR USE IN DIAGNOSIS AND THERAPY

(54) Bezeichnung: EISEN ENTHALTENDE NANOPARTIKEL MIT DOPPELTEM COATING UND ANWENDUNG IN DER DIAGNOSTIK UND THERAPIE

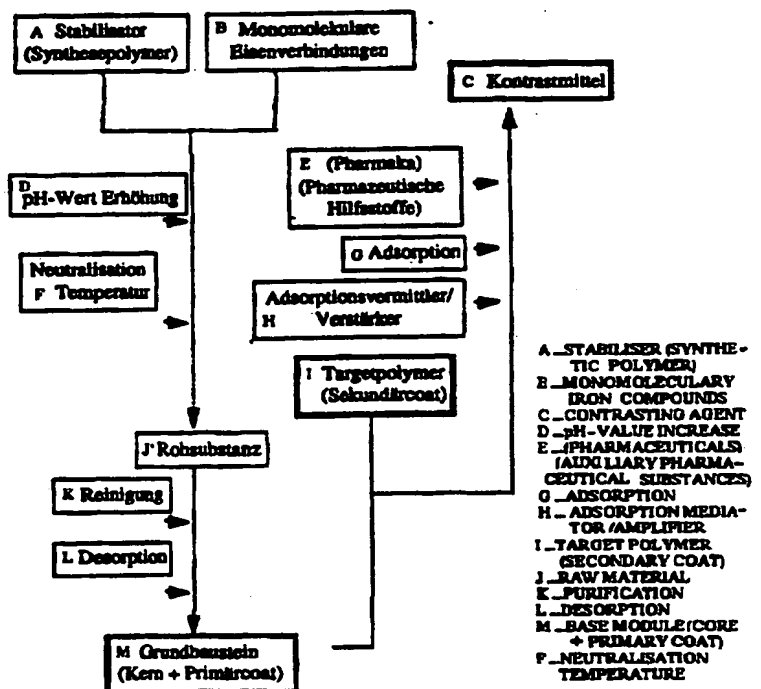
(57) Abstract

Modular iron-containing nanoparticles are disclosed, as well as their production and use in diagnosis and therapy. The nanoparticles are characterised in that they have an iron-containing core, a primary coat (synthetic polymer) and a secondary coat (target polymer), and optional auxiliary pharmaceutical substances, pharmaceuticals and/or adsorption mediators.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft modular aufgebaute Eisen enthaltende Nanopartikel, ihre Herstellung und Anwendung in der Diagnostik und Therapie. Die erfindungsgemäßen Nanopartikel zeichnen sich dadurch aus, daß sie aus einem Eisen enthaltenden Kern, einem Primärcoat (Synthesepolymer) und einem Sekundärcoat (Targetpolymer) sowie gegebenenfalls pharmazeutischen Hilfsstoffen, Pharmaka und/oder Adsorptionsvermittlern bestehen.

Herstellungsschema der erfindungsgemäßen Nanopartikel.
NANOPARTICLE PRODUCTION SCHEME



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

EISEN ENTHALTENDE NANOPARTIKEL MIT DOPPELTEM COATING UND ANWENDUNG IN DER DIAGNOSTIK UND THERAPIE

5

Die vorliegende Erfindung betrifft modular aufgebaute Eisen enthaltende Nanopartikel, ihre Herstellung und Anwendung in der Diagnostik und Therapie.

10

Substanzen, die schon bei niedriger Feldstärke maximal magnetisiert sind (hohe Sättigungsmagnetisierung), aber nach dem Abschalten des äußeren Magnetfeldes keine Restmagnetisierung (Remanenz) zeigen, da die thermische Energie einer permanenten Ausrichtung der spontan magnetisierten Weiß'schen Bezirke entgegenwirkt, werden als superparamagnetisch bezeichnet. Eisen enthaltende Kristalle, die als parenterale MR-Kontrastmittel entwickelt werden, fallen in diese Kategorie. Eine charakteristische Eigenschaft dieser Substanzen als MR-Kontrastmittel ist die starke Beeinflussung der Protonenrelaxationszeiten und damit die hohe Stärke als Kontrastmittel in diesem diagnostischen Verfahren. In der medizinischen Diagnostik wurden als superparamagnetische Kontrastmittel bisher hauptsächlich Eisenoxide mit "magnetitartiger" Kristallstruktur untersucht, die z. B. im Magnetit oder Maghämmit vorliegt (Spinell, inverses Spinell).

20

25

30

Die superparamagnetischen Eisenoxide, die als MR-Kontrastmittel verwendet werden sollen, zeigen vergleichbare Eigenschaften dahingehend, daß sie eine starke Beeinflussung der Protonen-Relaxation in ihrer Nahumgebung zeigen (hohe Relaxivität) und daß es sich um Partikel mit "magnetitartiger" Kristallstruktur handelt.

Es sind zahlreiche Verfahren zur Herstellung Eisen enthaltender Kristalle (Eisenoxide) mit superparamagnetischen Eigenschaften beschrieben.

- 5 Die verschiedenen Verfahren lassen sich unter unterschiedlichen Gesichtspunkten einteilen. Die Herstellung der superparamagnetischen Eisen enthaltenden Kristalle unterscheidet dabei zwei prinzipielle Verfahren, nämlich das Sinterverfahren mit hoher Temperatur und anschlie-
- 10 ßender mechanischer Zerkleinerung und die naß-chemische Synthese in Lösung. Für die medizinische Anwendung wurden bisher nur Partikel untersucht, die auf naßchemischem Wege hergestellt worden sind, während das Sinterverfahren zur Herstellung von Eisenoxiden für technische
- 15 (Tonträger, Farbpigmente und Toner) und biotechnische Anwendungen wie z. B. die Magnetseparationstechnik, beschrieben wurde [Schostek S, Beer A; DE 3,729,697 A1; Borelli NF, Luderer AA, Panzarino JN; US 4,323,056; Osamu I, Takeshi H, Toshihiro M et al.; JP 60,260,463
- 20 A2]. Die naßchemische Herstellung läßt sich weiter unterteilen. Bei der "Zweitopfsynthese" erfolgt erst die Herstellung des Eisen enthaltenden Kerns (Eisenoxid) und anschließend die Zugabe eines Stabilisators, um die physikalisch-galenische Qualität zu gewährleisten. Eine
- 25 Variante der "Zweitopfsynthese" ist die Herstellung des Eisenkerns an Ionenaustauschern. Bei der "Eintopfsynthese" erfolgt die Herstellung der Eisenoxide in Anwesenheit des Stabilisators, der die Kerne schon während der Präzipitation der Eisensalze umhüllt und so
- 30 die Aggregation und Sedimentation der Partikel verhindert.

- Neben der Unterscheidung nach dem Herstellungsgang in "Eintopf-" und "Zweitopfsynthese" kann eine Unterteilung
- 35 auch nach der Art des verwendeten Lösungsmittels in wäßrige [Hasegawa M, Hokukoku S; US 4,101,435; Fuji Rebio

K.K.; JP 59,195,161] und nicht-wäßrige Verfahren [Porath J, Mats L; EP 179,039 A2; Shigeo A, Mikio K, Toshikatzu M; J. Mater. Chem. 2(3); 277-280; 1992; Norio H, Saturo O; JP 05,026,879 A2] erfolgen.

5

Partikel, die nach einem "Zweitopfverfahren" in nicht-wäßrigen Lösungsmitteln hergestellt wurden, werden überwiegend in technischen Bereichen eingesetzt. Magnetische Eisenoxide, die als Kontrastmittel in der Humandiagnostik verwendet werden sollen, erfordern aus medizinisch-toxikologischen Gründen ein wäßriges Dispersionsmedium. Eine Sonderstellung nehmen bei dieser Einteilung die Partikel ein, die zwar in einem nicht-wäßrigen Lösungsmittel hergestellt wurden, sich aber nach der Herstellung in einem wäßrigen Medium stabil dispergieren lassen. Solche Partikel werden derzeit im Allgemeinen in der ex vivo Diagnostik, z. B. in der magnetischen Separationstechnik [Chagnon MS, Groman EV, Josephson L, et al.; US 4,554,088], verwendet, wurden aber auch für die in vivo Diagnostik vorgeschlagen [Pilgrimm H; US 5,160,725].

20

Partikel, die nach dem "Zweitopfverfahren" hergestellt wurden, fanden hauptsächlich bei den frühen experimentellen Untersuchungen bis Mitte der 80er Jahre Verwendung, während z. Zt. nur noch Untersuchungen mit Eisenoxiden beschrieben werden, die nach einer "Eintopfsynthese" hergestellt sind. Das "Eintopfverfahren" zur Herstellung der superparamagnetischen Eisen-enthaltenden Oxide für Anwendungen in der Humandiagnostik hat sich durchgesetzt, da die Partikel dem "Zweitopfverfahren" hinsichtlich der physikalisch-chemischen Qualität und der pharmazeutisch-galenischen Stabilität überlegen sind.

25

30

Auch die pharmazeutisch stabileren Suspensionen/Lösungen von Partikeln, die nach dem "Eintopfverfahren" in wäßrigen Medien hergestellt wurden, lassen sich weiter unter-

35

teilen in Eisenoxide unterschiedlicher Größe. Für die Partikel im Mikrometerbereich wurden biotechnische Anwendungen vorgeschlagen [Schröder U, Mosbach K; WO 83/01738 oder Schröder U; WO 83/03426] oder auch schon die in vivo
5 Verwendung in der Diagnostik oder Therapie beansprucht [Widder KJ, Senyei AE; US 4,247,406 oder Jacobsen T, Klaveness J; WO 85/04330]. Für medizinisch-diagnostische Ansätze werden jedoch heutzutage nur noch die Partikel im Nanometerbereich beschrieben. Auch der Nanometerbereich
10 läßt sich je nach der bevorzugten Verwendung in "große" (ca. > 50 nm Gesamtdurchmesser) und "kleine" (ca. < 50 nm Gesamtdurchmesser) Partikel unterteilen. Hauptanwendungsgebiet der großen Nanometerpartikel ist heute die Anwendung in der MR-Diagnostik von Leber und Milz, da
15 Partikel dieser Größenordnung schnell und nahezu vollständig von den Makrophagen dieser Organe aufgenommen werden [Kresse M, Pfefferer D, Lawaczek R; EP 516,252 A2 oder Groman EV, Josephson L; US 4,770,183]. Darüberhinaus wurden Vorschläge für die Verwendung als Verstärkersubstanzen in der klinischen Hyperthermie gemacht [Hasegawa
20 M, Hirose K, Hokukoku S, et al.; WO 92/22586 A1 und Gordon RT; US 4,731,239].

Bei nahezu allen derzeit für medizinische Anwendungen vorgeschlagenen Partikeln handelt es sich um Eisenoxide,
25 die in Anwesenheit von Dextran als Stabilisatorsubstanz hergestellt wurden [Bacic G, Niesmann MR, Magin RL et al.; SMRM - Book of abstracts 328; 1987; Ohgushi M, Nagayama K, Wada A et al.; J. Magnetic Resonance 29; 599-
30 601; 1978; Pouliquen D, Le Jeune JJ, Perdrisot R et al.; Magnetic Resonance Imaging 9; 275-283; 1991 oder Ferrucci JT und Stark DD; AJR 155; 311-325; 1990], beschrieben wurde aber auch die Verwendung anderer Polysaccharide wie Arabinogalactan [Josephson L, Groman EV, Menz E et al;
35 Magnetic Resonance Imaging 8; 616-637; 1990], Stärke [Fahlvik AK, Holtz E, Schroder U et al; Invest. Radiol.

25; 793-797; 1990], Glycosaminoglycanen [Pfefferer D, Schimpfky C, Lawaczek R; SMRM - Book of abstracts 773; 1993], oder auch von Proteinen [Widder DJ, Grief WL, Widder KJ et al.; AJR 148; 399-404; 1987].

5

Die genauen Synthesebedingungen wie Art der Eisensalze, Temperatur, Hüllpolymer (Stabilisator), Titrationsgeschwindigkeit, Alkaliwahl, Reinigung usw. beeinflussen die chemisch-physikalischen Eigenschaften und damit die pharmazeutisch-galenische Qualität und letztendlich den medizinischen Nutzen.

10

Ein wichtiger Schritt in der weiteren Entwicklung zu einer zielgerichteteren Anwendung geht auf Weissleder und Papisov [Weissleder R; Papisov MI; Reviews of Magnetic Resonance in Medicine 4; 1-20; 1992] zurück, die zeigen konnten, daß die "targetability" der magnetischen Eisenoxide sich umgekehrt zur Partikelgröße verhält. Problematisch ist in diesem Zusammenhang, daß zu kleinen Partikelgrößen die Wirksamkeit (MR-Effekt) der Partikel abnimmt. Die Herstellung besonders kleiner magnetischer Eisenoxide ohne Fraktionierungsschritte wurde kürzlich beschrieben [Hasegawa M, Ito Y, Yamada H, et al.; JP 4,227,792]. Für besonders kleine Partikel, MION's, wurden auch schon Experimente zum "functional imaging" publiziert, bei denen die Dextran-Hülle der Partikel (magnetische Label) mit Periodat oxidiert und anschließend mit spezifischen Molekülen gekoppelt wurden (Antimyosin; polyklonaler Antikörper) [Weissleder R, Lee AS, Khaw BA et al.; Radiology 182; 381-385; 1992 oder Weissleder R, Lee AS, Fishman A et al.; Radiology 181; 245-249; 1991].

15

20

25

30

35

Einen spezifischen Weg gehen Menz et al. [Menz ET, Rothenberg JM, Groman EV, et al.; WO 90/01295], die ihre großen Nanometerpartikel durch Polymere (Arabinogalactan)

mit physiologischen Effektorzellen umhüllen und, ebenso wie Gordon, der seine Dextran-stabilisierten Partikel mit Periodat oxidiert und dann Transferrin durch reduktive Aminierung koppelt [Gordon RT; US 4,735,796], einen spezifischen Aufnahmemechanismus über Rezeptor-vermittelte Endozytose, beanspruchen.

Die Herstellung "großer" superparamagnetischer Eisenoxide für die Anwendung als Kontrastmittel in der MR-Diagnostik von Leber und Milz ist heute "Stand der Technik" und der diagnostische Nutzen für diese Indikationen ist nachgewiesen. Vertreter dieser Eisenoxide befinden sich in der klinischen Entwicklung (SHU 555A; Schering AG Berlin; Deutschland; Phase II und AMI-25; Advanced Magnetics Inc.; Cambridge; Mass. ; USA; Phase III/IV).

Die Bedeutung der hydrodynamischen Durchmesser der Eisenoxide für spezifischere (extrahepatische) Ansätze wie die MR-Lymphographie oder die MR-Angiographie sind bekannt und werden bearbeitet. Bei sonst identischen Partikeln sollte die Bluthalbwertszeit mit kleinerem Durchmesser zunehmen. Aus der Literatur sind Syntheseverarianten zur Herstellung kleiner Eisenoxide bekannt.

Ein wesentliches Problem für die Weiterentwicklung spezifischer Kontrastmittel auf der Basis der superparamagnetischen Eisenoxide ist bisher, daß es nicht möglich ist, die Targeteigenschaften, also Anreicherung und Verteilung im Zielgewebe, zu verbessern ohne gleichzeitig Kompromisse bei den physikalisch-chemischen Parametern einzugehen, da die Stabilisatoren, die besonders gut zur Herstellung der Eisen-enthaltenden Kerne geeignet sind, nur sehr eingeschränkt zum Targeting der Substanzen verwendbar sind. Darüberhinaus limitieren die Reaktionsbedingungen bei der Synthese (pH-Extrema, Temperatur, Redoxreaktionen mit den Eisensalzen) die Auswahl der möglichen Stabilisatorsubstanzen, so daß ganze Gruppen wichtiger

und hochspezifischer Moleküle (Proteine, Peptide, Oligonukleotide aber auch die meisten Oligo- und Polysaccharide) nicht zur Stabilisierung bei der Herstellung verwendet werden können, zumindest dann nicht, wenn die Stabilisatoren nach der Synthese noch über Targeteigenschaften (biologische Aktivität) verfügen sollen.

Auch bei den bisher verwendeten (chemisch) "unempfindlichen" Polymeren - in der Hauptsache Dextran - ist bekannt, daß es unter den Bedingungen der Synthese zu vielfältigen und nicht kontrollierbaren Reaktionen kommt, so z. B. zur Depolymerisation im sauren pH-Bereich (niedermolekulares Dextran wird technisch z. B. durch Säurehydrolyse gewonnen) und verschiedenen Reaktionen bis zur völligen Zerstörung des Polymers im alkalischen Bereich (Präzipitationsschritt). Unter Berücksichtigung der Zuckerchemie und der notwendigen Reaktionsbedingungen ist also davon auszugehen, daß die "Dextran-Magnetite" nach dem "Stand der Technik" gar keine Dextran-Magnetite sind, da zwar Dextran zur Stabilisierung eingesetzt wurde, es sich aber nach der Synthese nicht mehr um Dextran handelt.

Unter pharmazeutischen und zulassungsrelevanten Gesichtspunkten heißt das, daß ein wesentlicher Bestandteil - der Stabilisator ist ja die Hülle und bestimmt damit überwiegend das biologische Verhalten - nicht bekannt oder deklariert ist.

Aus praktischen Gründen ergibt sich zusätzlich das Problem, daß eine Optimierung der Oberflächeneigenschaften für die weitere Entwicklung unmöglich erscheint, wenn die Oberfläche gar nicht bekannt ist.

Am Beispiel einer spezifischen Anwendung wie der am besten untersuchten MR-Lymphographie, läßt sich zeigen, daß mit den Partikeln nach dem "Stand der Technik" unter

Verwendung von Dextran als Stabilisator - andere Polymere zur Herstellung der besonders kleinen Eisenoxide wurden bisher nicht publiziert -, die Optimierung der Größe zwar die Anwendbarkeit verbessert und eine sehr hohe Akkumulation der Partikel im Lymphgewebe erzielt werden kann, aber für eine klinische Anwendung ist die Homogenität der inter-lymphnodalen Verteilung bisher unzureichend [Taupitz, M et al.; SMRM - Book of abstracts 500; New York; USA; 1993]. Die zwar insgesamt sehr hohe aber inhomogene Anreicherung läßt bei dieser Anwendung auch nicht erwarten, daß eine weitere Verbesserung durch nochmalige Optimierung der hydrodynamischen Durchmesser erreicht werden kann.

Ein wesentliches Problem bei der Entwicklung spezifischer Diagnostika ist die geringe Größe des Zielorgans. So repräsentieren z. B. die gesamten Lymphknoten weniger als ein Prozent des Körpergewichtes. Potentielle Diagnostika müssen also eine hohe Anreicherung im Zielgewebe (Spezifität) zeigen und schon in geringer Konzentration eine starke Kontrastbeeinflussung ermöglichen.

Da die superparamagnetischen Eisenoxide z. Zt. die Substanzklasse mit der stärksten MR-Kontrastbeeinflussung darstellen, erscheinen die Partikel für spezifische Anwendungen besonders geeignet. Ein Problem bei dieser Substanzklasse ist der Kristallkern der Eisenoxide, der den partikulären Charakter der Substanzen bedingt und die Partikelgröße wesentlichen Einfluß auf das biologische Verhalten hat. Kleinere Partikelgrößen verbessern die Steuerbarkeit, aber die Effektivität der Kontrastmittel nimmt wegen des Zusammenhangs zwischen der Kerngröße und dem magnetischen Moment zu den kleineren Größen ab, so daß hier ein Kompromiß zwischen kontrastbeeinflussender Wirkung (Physik) und Steuerbarkeit (Biologie) gewählt werden muß. Prinzipiell ist zu fordern, daß der Eisen-

enthaltende Kern so groß wie möglich sein sollte, um eine hohe Wirksamkeit zu erreichen, wobei allerdings der Gesamtdurchmesser klein bleiben muß.

- 5 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eisenhaltige Nanopartikel zur Verfügung zu stellen, welche die Forderungen der Physik und der Biologie an ein spezifisches Nanopartikel optimal erfüllen.
- 10 Überraschenderweise stellte sich heraus, daß die erfindungsgemäßen Nanopartikel den bisherigen Eisenoxid-Partikeln nach dem Stand der Technik hinsichtlich der Targetfähigkeit überlegen sind. Durch die Kombination der physikalischen Qualität mit der verbesserten Targetfähigkeit
- 15 der Nanopartikel lassen sich Kontrastmittel oder auch Therapeutika/therapeutische Trägersysteme mit bisher unerreichter "targetability" herstellen.

- 20 Die Herstellung der Nanopartikel erfolgt aus einzelnen Bausteinen (modulares Prinzip) und gewährleistet dadurch höchste Flexibilität bei der Kombination der Eisen enthaltenden Kerne (physikalische Wirksamkeit; Kontrast) mit der Targetkomponente (biologisches Verhalten). Ein modularer Aufbau hat den Vorteil eine lagerfähige Komponente
- 25 (Eisen-enthaltender Kern) mit möglicherweise empfindlichen Molekülen zur Steuerung erst "just in time" zum fertigen Nanopartikel zu kombinieren. Diese Anlehnung an die aus der klinischen Radiopharmazie bekannten "Cold-Kits" ermöglicht es z. B. auch individuelle Serumkomponenten einzelner Patienten als Steuerungsmolekül zu
- 30 nutzen (z. B. autologe Antikörper).

- Aufgrund ihrer intensiven Färbung gelingt es, die Nanopartikel auch visuell zu detektieren, wie es z. B.
- 35 bei der Verwendung als optische Markersubstanz in der chirurgischen Medizin wünschenswert ist.

Darüber hinaus sind die Nanopartikel auch für den Einsatz in der Therapie, z. B. durch ein magnetisches Targeting mit externen Magneten über einem Zielvolumen, verbunden mit einer magnetisch gekoppelten Freisetzung von Wirksubstanzen, geeignet. Die Nanopartikel können in z. B. Tumoren akkumuliert werden und ermöglichen daher die Verwendung als spezifische Verstärkersubstanzen in der lokalen Hyperthermie.

10

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel bestehen aus einem Eisen enthaltenden Kern, einem Primärcoat (Synthesepolymer) und einem Sekundärcoat (Targetpolymer) sowie gegebenenfalls pharmazeutischen Hilfsstoffen, Pharmaka und/oder Adsorptionsvermittler.

15

Der Eisen enthaltende Kern liegt als Partikel, Kolloid oder Kristall vor. Aus der Herstellung des Kerns enthalten die Nanopartikel Synthesepolymer, das den Kern als Primärcoat umhüllt und während der Herstellung zur Steuerung der physikalischen oder pharmazeutisch-galenischen Qualität benötigt wird. Anschließend wird das Verhältnis von Synthesepolymer zu Eisen durch ein Desorptionsverfahren auf einen gewünschten Wert eingestellt. Für die Anwendung in der spezifischen Diagnostik wird ein Targetpolymer adsorbiert, das die Oberfläche der Nanopartikel darstellt und den Grundbaustein aus Kern und Primärcoat umhüllt. Zur Verbesserung der Adsorption zwischen dem Primär- und dem Sekundärcoat können Adsorptionsvermittler enthalten sein. Als weitere Bestandteile können die Nanopartikel pharmazeutische Hilfsstoffe oder Pharmaka enthalten.

20

25

30

Eine schematische Darstellung des Aufbaus eines erfindungsgemäßen Nanopartikels ist in Abbildung 1 dargestellt.

35

Der hydrodynamische Durchmesser des Grundbausteins (Eisen
enthaltender Kern und Primärcoat) in Lösung ist kleiner
als 100 nm, bevorzugt kleiner als 50 nm, und höchstens
5 fünfmal so groß wie der Durchmesser des Eisen enthal-
tenden Kerns.

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel zeichnen sich weiter-
hin dadurch aus, daß sie als stabile kolloidale Sole in
10 pharmazeutischer Qualität vorliegen, oder daß sie lyophi-
lisiert vorliegen und leicht mit medizinisch verwendeten
Lösungsmitteln (Elektrolytlösung, Plasmaexpander, Gluco-
selösung, phys. Kochsalzlösung etc.) wieder in Lösung
15 gebracht werden können oder daß Grundbaustein und Tar-
getkomponente und gegebenenfalls Zusätze getrennte Lösun-
gen sind, die auch als Lyophilisate vorliegen können, und
erst zu einem beliebigen Zeitpunkt zur Applikationslösung
zusammengemischt werden.

20 Der Eisen enthaltende Kern hat ein größeres magnetisches
Moment als Eisen-II-oder Eisen-III-Ionen. Der Eisen
enthaltende Kern ermöglicht durch seine magnetischen
Eigenschaften die Kontrastierung bei der Verwendung als
Kontrastmittel in der MR-Tomographie. Um eine optimale
25 Kontraststärke zu erreichen, sollte der Kern superpara-
magnetisch sein oder zumindest superparamagnetische
Anteile enthalten, d. h., daß der Kern als Kristall oder
polyatomarer Komplex ("Partikel") vorliegen muß, da diese
Art des Magnetismus nur in Festkörpern möglich ist.

30 Erfindungsgemäß kann der Eisen enthaltende Kern Magnetit
oder Maghämīt darstellen oder enthalten.

Bis zu 25 Gew.-% des im Kern enthaltenden Eisens können
35 durch andere Metallionen ersetzt sein.

Die Nicht-Eisen-Metallionen sind paramagnetisch, diamagnetisch oder eine Mischung von beiden.

5 Ferner zeichnen sich die erfindungsgemäßen Nanopartikel dadurch aus, daß der Eisen enthaltende Kern einen durch Elektronenmikroskopie bestimmten Durchmesser kleiner als 30 nm, bevorzugt kleiner als 15 nm, aufweist und mindestens 50 Metallatome enthält sowie eine Partikelgrößenverteilung, wobei mindestens 90 % der Eisen enthaltenden
10 Kerne im Bereich 0,7-Mittelwert bis 1,3-Mittelwert liegen, aufweist.

Die Nanopartikel enthalten ein Synthesepolymer in einer Menge zwischen dem 0,01fachen und dem 1fachen der Summe
15 der vorhandenen Metallionen. Bevorzugt ist eine Menge zwischen dem 0,25fachen und dem 0,75fachen.

Als Synthesepolymer wird eine monomere oder polymere Substanz oder ein Gemisch dieser Substanzen oder Derivate, oder Derivate mit funktionellen Gruppen oder
20 Derivate, die zusätzlich substituiert worden sind, mit einem Molekulargewicht kleiner 100.000 Da eingesetzt. Bevorzugt werden Substanzen mit Molekulargewichten, die kleiner 10000 oder 5000 Da sind, verwendet.

25 Besonders bevorzugt wird als Synthesepolymer ein Dextran-derivat oder eine Mischung von Dextran und/oder Dextran-derivaten eingesetzt.

30 Das Synthesepolymer kann eine oder mehrere Säuregruppen oder mehrere funktionelle Gruppen im Molekül enthalten, die bevorzugt N, S, P oder O-Atome enthalten.

Das Target- und das Synthesepolymer können unterschiedliche oder gleiche Substanzen oder Substanzgemische sein,
35 wobei das Targetpolymer aber nicht den Bedingungen der

Synthese unterliegt und damit auch nicht den Nebenreaktionen des Synthesepolymer bei der Synthese unterlag, also noch in physiologischem Zustand ist.

5 Die Grundsubstanz aus Eisen enthaltendem Kern und Synthesepolymer bestimmt die physikalische Qualität des Nanopartikels, während das Targetpolymer das biologische Verhalten der Nanopartikel bestimmt.

10 Das Targetpolymer ist in dem Nanopartikel in einer Gewichtsmenge zwischen dem 0,5-fachen bis 50-fachen, bevorzugt zwischen dem 1-fachen bis 25-fachen des Gewichts der vorhandenen Metallionen enthalten.

15 Die erfindungsgemäßen Nanopartikel enthalten Adsorptionsvermittler, deren Menge kleiner oder gleich der Summe des Gewichts der enthaltenen Metallionen ist. Durch die Adsorptionsvermittler wird die Adsorption des Targetpolymers an den Grundbaustein aus Eisen enthaltenden
20 Kern/Synthesepolymer verstärkt oder erst ermöglicht.

Bevorzugt werden als Adsorptionsvermittler Peptide mit den Strukturen RRTVKHHVN, RRSRHH oder auch RSKRGR, oder Teilstrukturen davon, eingesetzt.

25 Der hydrodynamische Durchmesser inclusive aller Bestandteile der Nanopartikel ist höchstens zehnmal größer als der Durchmesser des Eisen enthaltenden Kerns und höchstens 20 % größer als der Durchmesser des Grundbausteins.
30

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel setzen sich aus einzelnen Modulen wie Grundbaustein, Targetpolymer, Pharmakon und Adsorptionsvermittler zusammen, die
35 jederzeit kombinierbar sind.

Bei den Präparationen der Nanopartikel handelt es sich um niedrigviskose wäßrige kolloidale Lösungen oder Suspensionen von Eisen enthaltenden stabilisierten Partikeln im Nanometerbereich. Die Lösungen der Nanopartikel enthalten
5 keine größeren Aggregate und sind intravenös applizierbar, so daß Forderungen internationaler Arzneibücher an Parenteralia hinsichtlich der Partikelgrößen erfüllt sind.

10 Im allgemeinen kann der Grundbaustein durch Hitzeverfahren sterilisiert werden. Das Verfahren zur "Sterilisation" der fertigen Nanopartikel richtet sich nach der Empfindlichkeit des Sekundärcoats, aber eine keimfreie aseptische Herstellung ist in jedem Fall
15 gewährleistet. Eine "Sterilfiltration" kann wegen der geringen Größe der Partikel immer durchgeführt werden. Die Option, ein empfindliches Targetpolymer mit dem sterilisierbaren Grundbaustein erst kurz vor der Verwendung herzustellen, ist eine weitere Möglichkeit eine
20 praktisch sterile Applikationslösung zu gewährleisten.

Die Nanopartikel sind gut verträglich und weisen z. B. bei der Verwendung als MR-Kontrastmittel einen ausgesprochen günstigen Sicherheitsabstand zwischen diagnostischer
25 Dosis und der letalen Dosis auf ("margin of safety"). Die diagnostische Dosis liegt, je nach spezieller Anwendung, etwa zwischen 5 und 200 μmol (Eisen) pro Kilogramm Körpergewicht, während die letale Dosis etwa zwischen 20 und 50 mMol/kg Körpergewicht einzuordnen ist (gemessen an der
30 Ratte).

Die Substanzen sind vollständig bioabbaubar. So wird der Eisen enthaltende Kern aufgelöst und das Eisen in den physiologischen Eisenstoffwechsel eingebracht. Im Allgemeinen können auch die als Synthesepolymer oder Targetpolymer benutzten Moleküle metabolisch in verwertbare
35 Grundbausteine (Zucker; Aminosäuren) abgebaut werden.

- Die Lösungen der Nanopartikel sind sehr stabil und es findet nach der Fertigstellung keine feststellbare Änderung physikalischer Parameter statt (Partikelgröße, magnetische Eigenschaften). Bei keimfreier Herstellung weisen die Lösungen eine lange Lagerfähigkeit auf; es wurden z. B. innerhalb von 12 Monaten keine Instabilitäten wie Aggregation oder Sedimentation festgestellt.
- Die Lösungen oder Suspensionen sind rotbraun bis schwarz gefärbt, was auf die intensive Farbe der Eisen enthaltenen Kristalle zurückzuführen ist. Die ausgeprägte Eigenfarbe kann zur visuellen Detektion, z. B. als Markersubstanz in der chirurgischen Medizin, genutzt werden. Für die Detektion mit der MR-Technik sind die Nanopartikel superparamagnetisch oder enthalten superparamagnetische Anteile. Die Partikel zeigen physikalisch sehr hohe Sättigungsmagnetisierungen, die schon bei niedrigen angelegten Feldstärken erreicht werden und weisen nach dem Abschalten eines externen Magneten keine Restmagnetisierung mehr auf, sie zeigen keine Remanenz.
- Die Nanopartikel sind als Lösungen (Suspensionen) formuliert und können ohne weitere Vorbereitung appliziert werden. Da die Lösungen der Nanopartikel kompatibel mit üblichen medizinischen Lösungsmitteln wie physiologischer Natriumchloridlösung, Elektrolytlösungen oder Zuckertlösungen sind, können die Partikel beliebig verdünnt und z. B. für spezielle Anwendungen auch infundiert werden.
- Eine Alternative zur Formulierung der "Lagerform" Lösung stellt die Herstellung von Lyophilisaten dar. Möglich ist hier die Lyophilisation des Grundbausteins, der dann im gelösten Targetpolymer resuspendiert wird, oder Grundbaustein und Nanopartikel werden nach der Adsorption lyophilisiert und dann vor der Anwendung in phys. NaCl oder

Aqua ad injectabilia wieder gelöst. Die Vorratshaltung kann auch so erfolgen, daß Grundbaustein und Targetpolymer in getrennten Lösungen aufbewahrt werden und erst vor der Applikation gemischt werden.

5

Die Herstellung der partikulären oder kolloidalen Eisen-
enthaltenden Kerne erfolgt aus monomolekular gelösten
Eisenverbindungen durch Änderung des pH-Wertes und
dadurch bewirkte Ausfällung in Anwesenheit einer
10 Stabilisatorsubstanz (Synthesepolymer) nach einer
"Eintopfsynthese". Das Synthesepolymer separiert die
Kristallkerne während der Herstellung und dient so zur
Steuerung der Partikelgröße. Das Synthesepolymer ist
15 wesentlich für die physikalischen und pharmazeutisch-
galenischen Eigenschaften nicht nur des Kristallkerns
sondern auch des gesamten Nanopartikels. Das
Synthesepolymer ermöglicht es, eine stabile Lösung
(Suspension) zu erhalten, da die Kerne soweit voneinander
20 getrennt sind, daß keine Aggregation mehr stattfinden
kann (sterische Stabilisierung).

Nachdem die Eisen enthaltenden Kernpartikel fertigge-
stellt sind, wird das Synthesepolymer durch ein
25 Desorptionsverfahren auf ein vorgegebenes Synthesepolymer
zu Eisen-Verhältnis eingestellt. Die Lösung (Suspension)
aus Eisen-Kern und Rest-Synthesepolymer, das den Eisen
enthaltenden Kern als Primärcoat umhüllt und
stabilisiert, stellt den Grundbaustein des modularen
30 Systems dar. Der Grundbaustein zeichnet sich hierbei
durch hohe physikalisch-galenische Qualität aus.

Ein zweiter wesentlicher Baustein ist das Targetpolymer,
daß postsynthetisch an den Grundbaustein adsorbiert wird
35 und den Kern mit dem Primärcoat mit einer zweiten Hülle
umgibt (Sekundärcoat). Der Sekundärcoat stellt die Ober-

fläche der Nanopartikel dar und bestimmt das In-vivo-Verhalten. Die Mischung zwischen dem Grundbaustein und dem Targetpolymer kann zu beliebiger Zeit erfolgen, so daß auch eine "just in time" Herstellung möglich ist.

5

Die Adsorption zwischen Rest-Synthesepolymer und Targetpolymer kann durch einen zwischengeschalteten Schritt mit Zugabe von Adsorptionsvermittlern verbessert oder auch erst ermöglicht werden. Die Zugabe des Adsorptionsvermittlers kann auch in einem Schritt in einer Mischung mit dem Targetpolymer erfolgen. In analoger Weise können zu einem beliebigen Zeitpunkt pharmazeutische Hilfsstoffe oder auch Pharmaka zugesetzt werden.

10

15

Die besonderen Vorteile der Erfindung sind offensichtlich, da es mit dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren erstmals gelingt, Forderungen der Physik und der Biologie an ein spezifisches Nanopartikel optimal zu erfüllen.

20

Aufgrund des modularen Aufbaus, d. h. getrennte Herstellung von Grundbaustein (Eisen enthaltender Kern + Primärcoat) und Targetprinzip (Sekundärcoat), kann für die Synthese das für die physikalischen Eigenschaften optimalste Synthesepolymer gewählt werden ohne durch die erwünschte biologische Steuerbarkeit der Nanopartikel limitiert zu sein; - erstmals müssen also keine Kompromisse bzgl. der physikalisch-pharmazeutischen Qualität der Nanopartikel und der gewünschten biologischen Wirkung gemacht werden. Das Targetpolymer unterliegt nicht den zerstörenden Bedingungen der Synthese, so daß viele Substanzen zur Zielfindung eingesetzt werden können, die bisher von vornherein ausgeschlossen waren. Ebenso muß keine postsynthetische Chemie, die ihrerseits adäquate Reaktionsbedingungen erfordert und die Integrität des Liganden beeinträchtigt, angewandt werden; es finden z.

25

30

35

B. keine Redoxreaktionen mit Disulfidbrücken-enthaltenden Proteinen wie bei der Periodat-Oxidation mit anschließender reduktiver Aminierung, statt - die biologische Aktivität bleibt erhalten.

5

Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist, daß keine Reinigung von Grundbaustein-Targetpolymer erfolgen muß, da keine Reaktionslösungen, wie z. B. Periodat, abgetrennt werden müssen - die Methode ist also schnell und es können daher auch "just in time" Nanopartikel direkt vor der Applikation hergestellt werden, wie es z. B. bei "individuellen" Kontrastmitteln (z. B. autologe Antikörper) nötig ist oder vorteilhaft sein kann, wenn das Targetpolymer in Lösung nur kurzzeitig stabil ist.

15

Auch für eine weitere Optimierung zeigt die erfindungsgemäße Herstellung Vorteile, da hier die "Oberfläche" der Nanopartikel separat modifiziert/optimiert werden kann und sich eine Analyse auch mit modernen Analysemethoden wie der NMR-Spektroskopie oder der IR-Spektroskopie durchführen läßt; Methoden die in Anwesenheit des partikulären Kerns nicht anwendbar sind.

20

Da die Oberfläche definiert hergestellt ist und auch adäquat analysiert werden kann, ist eine systematische Optimierung der Oberflächeneigenschaften möglich, während bei der Herstellung nach dem "Stand der Technik", welcher die Partikel als eine einheitliche Substanz ansieht, die Oberfläche gar nicht bekannt ist und eine Optimierung daher auch nur über "try and error" möglich ist.

25

30

Die Nanopartikel werden in mehreren Stufen hergestellt. Der Eisen enthaltende Kern wird prinzipiell nach einer "Eintopfsynthese", also in Anwesenheit einer Stabilisatorsubstanz (Synthesepolymer), synthetisiert. Die Stabi-

35

lisatorsubstanz (Synthesepolymer) wird in Wasser gelöst und mit den monomolekularen Eisenverbindungen versetzt. Durch pH-Erhöhung werden die Eisensalze zu den vorzugsweise Oxiden umgesetzt und ausgefällt. Als Variante kann
5 auch die Stabilisatorlösung alkalisch gestellt und dann mit den Eisensalzen versetzt werden. Das Gemisch wird unter Rückfluß erhitzt und dann neutralisiert, wobei Erhitzen und Neutralisieren auch in umgekehrter Reihenfolge stattfinden kann. Die Rohsubstanz wird gereinigt
10 und dann wird das überschüssige oder nicht fest adsorbierte/gebundene Synthesepolymer durch ein Desorptionsverfahren auf ein exaktes Gewichtsverhältnis von Eisen zu Stabilisator eingestellt. Diese gereinigte und desorbier-
15 te Grundsubstanz aus Kern und (Rest-) Synthesepolymer stellt den Grundbaustein der modular aufgebauten Nanopartikel dar. Optional kann hier eine Hitzesterilisation angeschlossen werden. Bei Bedarf oder "auf Vorrat" wird das gewählte Targetpolymer, gegebenenfalls unter Zwischenadsorption oder Ko-Adsorption eines Adsorptionsvermittlers, an den Grundbaustein adsorbiert. Optional
20 können weitere Bestandteile wie pharmazeutische Hilfsstoffe oder Pharmaka zugegeben werden. Das allgemeine Herstellungsverfahren ist in der Abbildung 2 schematisch zusammengefaßt.

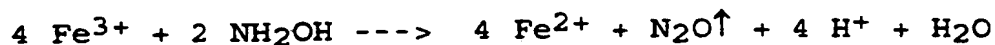
25 Bei der folgenden Beschreibung des Eisen enthaltenden Kerns muß berücksichtigt werden, daß die Synthese immer in Anwesenheit des Stabilisators nach einer "Eintopfsynthese" durchgeführt wird.

30 Zur Herstellung der Eisen enthaltenden Kerne werden stöchiometrische Mengen von Eisen-II und Eisen-III-Salzen miteinander gemischt. Die Qualität der entstehenden Kristalle wird dabei auch von den eingesetzten Salzen
35 beeinflußt und im Allgemeinen werden in der Literatur die Salze der Salzsäure, also die Eisenchloride, eingesetzt.

Prinzipiell sind hier aber alle Salze starker Säuren, also z. B. auch die Sulfate oder Nitrate verwendbar. Problematisch ist es, bei der Verwendung dieser Salze eine exakte Stöchiometrie zu gewährleisten, da die Eisen-II-Salze sehr oxidationsempfindlich sind. Vorteile ergeben sich hier durch die Verwendung komplexerer Salze wie z. B. dem Mohr'schen Salz, das nicht so oxidationsempfindlich ist.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß die Verwendung organischer Salze den anorganischen Salzen überlegen ist, da die organischen Anionen als Stabilisator oder Hilfsstabilisator wirken. Als besonders geeignet hat sich hier z. B. das Eisen-II-gluconat, oder das Eisen-III-citrat herausgestellt; verwendet werden können aber auch andere organische Anionen, wie z. B. die Fumarate, Tartrate, Lactate oder Salicylate.

Durch eine Synthesevariante, die nur von Eisen-III-Salz ausgeht, gelingt zum einen die Herstellung ohne die oxidationsempfindlichen Eisen-II-salze zu verwenden und zum anderen kann die Anzahl an "Fremdionen" reduziert werden. Diese Synthesevariante geht nur von Eisen-III-Salz aus, aus dem in situ durch eine berechnete Menge Reduktionsmittel Eisen-II erst durch die Reaktion generiert wird. Obwohl prinzipiell alle Reduktionsmittel eingesetzt werden können, die Eisen-III stöchiometrisch exakt reduzieren, wird die Verwendung von Hydroxylamin bevorzugt, da das umgesetzte Hydroxylamin quantitativ zu Lachgas umgesetzt und dadurch sehr einfach komplett aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden kann.



Ein Nachteil aller bisher beschriebenen Verfahren wird ersichtlich, wenn man sich die Chemie der Eisensalze

näher betrachtet. Ziel des Präzipitationsschrittes ist es, Eisen-II und Eisen-III in stöchiometrischer Zusammensetzung zu einem Kristall mit definierter Kristallstruktur umzusetzen. Die Bildung der entsprechenden Oxide wird durch die pH-Wert Erhöhung erreicht. Berücksichtigt man jedoch, daß schon bei einem pH-Wert von ca. 2 die Eisen-III-Ionen [pKL $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ca. 37*] schwerlösliche Hydroxide bilden, während die Eisen-II-Ionen erst bei pH 8 als Hydroxide [pKL $\text{Fe}(\text{OH})_2$ ca. 13,5] ausfallen, so wird ersichtlich, daß eine direkte Bildung der gewünschten Kristalle kaum möglich erscheint und der Weg nur über eine Folgereaktion der Hydroxide stattfindet. Durch Verwendung geeigneter Komplexbildner ist es jedoch möglich die Fällungspunkte der Eisenverbindungen gegeneinander zu verschieben, so daß eine gleichzeitige Fällung und der Einbau auf die unterschiedlichen Gitterplätze im Eisenoxid-Kristall erfolgen kann. Durch die Wahl des Komplexbildners können die Fällungspunkte der eingesetzten Eisenverbindungen über weite Bereiche gesteuert werden.

*Die pKL-Werte sind von der Konzentration abhängig und die Angaben beziehen sich auf eine 10^{-2} Mol/l-Lösung.

Als Komplexbildner können neben den "klassischen" Substanzen nach Tabelle 1 auch die o. g. organischen Anionen eingesetzt werden. Komplexe Salze, organische Anionensalze und anorganische Salze der Eisen-II und Eisen-III-Ionen können auch beliebig miteinander kombiniert werden.

Tab. 1: Auswahl an Komplexbildnern und Chelatoren für die Verschiebung der Fällungspunkte bei der pH-Erhöhung während der Magnetitsynthese

Komplexbildner (Chelat)	Eisen-II logK ₁ *	Eisen-III logK ₁ *
CDTA trans-1,2-Diamino-cyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure	16,27	28,05
EDTA Ethyldiamintetraessigsäure	14,33	25,10
EGTA Ethylenglycol-O,O'-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure	11,92	20,50
DTPA Diethylentriamin-pentaessigsäure	16,50	28,60
HEDTA N-(2-Hydroxyethyl)-ethyldiamin-N,N',N'-triessigsäure	12,20	19,80
NTA Nitrilotriessigsäure	8,84	15,87
TTHA Triethylentetramin-N,N,N',N'',N''',N''''-hexaessigsäure	17,10	26,80

- 5 * K₁ ist die absolute Stabilitätskonstante und ist unabhängig vom pH. Sie bezieht sich auf die deprotonierte Form des Chelators: $K_1 = [ML] / [M] \cdot [L]$, wobei [ML], [M] und [L] die Konzentrationen von Chelat, Metallion und Chelator (Ligand) sind.
- 10

In einer Variante der Synthese erfolgt zunächst eine getrennte Herstellung von Eisen-II-hydroxid und Eisen-III-hydroxid. Die Herstellung der Eisenoxid-Kristalle gelingt überraschenderweise auch durch die Kombination
5 der separat hergestellten Hydroxid-Lösungen, wobei ein Erhitzen der kombinierten Lösungen die Kristallisation beschleunigt.

Ein wichtiger Schritt bei der Herstellung der Eisen-
10 enthaltenden Kerne ist der Präzipitationschritt, bei dem durch pH-Wert Erhöhung aus den niedermolekularen Eisenverbindungen die partikulären Eisenverbindungen gebildet werden, wobei die Bildung der Partikel ggf. über die Bildung kolloidaler Eisenhydroxide erfolgen kann. Für die
15 pH-Wert Erhöhung ist prinzipiell jede Substanz geeignet, die den pH-Wert der sauren Lösung der Eisensalze erhöhen kann. Neben der Verwendung von Natronlauge ist die pH-Wert Erhöhung durch Ammoniak, sowohl als Gas als auch als Salz, oder die Anwendung basischer Amine und flüchtiger
20 Puffer, bevorzugt. Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß die zur Präzipitation verwendete Base die Gesamteigenschaften so beeinflusst, daß auch "biologische" Auswirkungen sichtbar werden, so z. B. Unterschiede in der Organverteilung der Partikel.

25 Die Konzentration der basischen Substanz soll dabei im Bereich 0,1 bis 10 N liegen, bevorzugt sind hier konzentrierte Lösungen von etwa 1-4 N, da mit zunehmender Geschwindigkeit der pH-Wert-Erhöhung die Bildung von
30 Partikeln mit kleinen Kerngrößen bevorzugt stattfindet. Die Zugabe der Basen erfolgt innerhalb von 30 Minuten, vorzugsweise aber innerhalb von 30 Sekunden.

Die Präzipitation der Eisenverbindungen zu den Partikeln
35 erfolgt im Temperaturbereich von 0-120 °C, wobei der Bereich 50 - 80 °C bevorzugt ist. Prinzipiell gilt, daß

die Temperatur niedrig sein kann, wenn direkt das Eisenoxid gebildet wird, und hoch sein muß, wenn die Bildung über die Hydroxide als Zwischenschritt erfolgt. Nach der Präzipitation erfolgt die Neutralisation und
5 dann, insbesondere wenn zunächst die Hydroxide vorliegen, ein Erhitzen der Rohsubstanz unter Rückflußbedingungen, wobei die Dauer des Erhitzens zwischen 0 Minuten und 24 Stunden, vorzugsweise zwischen 30 Minuten und einer Stunde liegt. Neutralisation und Erhitzen unter Rückfluß-
10 bedingungen können dabei auch in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt werden.

Für die Anwendung als Kontrastmittel (optische Markersubstanz) bei visueller Detektion ist eine hohe Eigenfärbung
15 wünschenswert. Die Anwendung als Kontrastmittel in der Magnetresonanz-Tomographie (MRT) erfordert eine hohe Wirksamkeit, die bei diesem Tomographieverfahren durch die magnetischen Eigenschaften der Nanopartikel bestimmt wird. Aufgrund der hohen Sättigungsmagnetisierung schon
20 bei niedrigen angelegten Feldstärken, wie sie in der klinischen MRT verwendet werden, erscheinen die Eisenoxide Maghämrit und Magnetit bei der Verwendung der Nanopartikel als MR-Kontrastmittel besonders geeignet. Die besonderen magnetischen Eigenschaften werden hier
25 durch die Kristallstruktur der partikulären Eisenkerne festgelegt. Überraschenderweise ist es jedoch möglich, Fremdionen in den Kristallkern einzubauen und trotzdem zu der magnetitartigen Kristallstruktur zu gelangen. Diese Dotierung mit Nicht-Eisenhaltigen Metallionen kann
30 prinzipiell über zwei Wege erfolgen. Zum einen können Eisen-II und/oder Eisen-III-Ionen auf ihren Gitterplätzen durch andere paramagnetische Metallionen ersetzt werden und zum anderen kann die Substitution auch mit
35 diamagnetischen Ionen erfolgen. Zum Verständnis sei daran erinnert, daß die Magnetisierung im Magnetitkristall nur von den Eisen-II-Ionen herrührt, da die Eisen-III-Ionen

parallele/antiparallele Gitterplätze besetzen und sich in ihrer magnetischen Wirkung genau aufheben. Eine Erhöhung der Netto-Magnetisierbarkeit des Kristalls kann erfolgen, wenn Ionen mit stärkeren magnetischen Eigenschaften als Eisen verwendet werden, oder wenn durch para- oder diamagnetische Ionen das genau gleiche Besetzungsverhältnis auf den parallelen /antiparallelen Gitterplätzen für die Eisen-III-Ionen verändert wird. Für die Substitution mit paramagnetischen Metallen durch stärkere magnetische Ionen, wie z. B. Gadolinium kann dabei eine Erhöhung um die Differenz des magnetischen Momentes im Vergleich zum ersetzten Eisen erfolgen. Bei der Substitution von Eisen-III mit diamagnetischen Metallen kann das jetzt nicht mehr kompensierte Moment eines Eisen-III-Ions zum Gesamtmoment beitragen. In einer Variante können auch dia- und paramagnetische Ionen zusammen in das magnetitartige Kristallgitter eingebaut werden. Die Dotierung mit den Nicht-Eisen-Ionen erfolgt durch teilweise Substitution der niedermolekularen Eisen-haltigen Ausgangsverbindungen in der Synthese.

Die allgemeine Herstellung der Eisen enthaltenden Kerne hat zum Ziel, ein magnetitartiges Kristallgitter zu synthetisieren. Für diesen Zweck werden Eisen-II und Eisen-III-Ionen in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 eingesetzt. Am einfachsten gelingt die Synthese, wenn ein genau stöchiometrisches Verhältnis von 1:2 verwendet wird. Die Verhältnisse von Eisen-II zu Eisen-III können auch durch die Reduktion von Eisen-III während der Synthese durch ein Reduktionsmittel erhalten werden. Eisen-II und/oder Eisen-III-Ionen können bis zu 25 % des Gesamteisens (Gewicht) durch andere Metallionen ersetzt sein. Neben paramagnetischen Ionen wie Gadolinium oder Mangan können auch diamagnetische Ionen wie Lithium, Magnesium oder Calcium, oder eine Mischung para- und diamagnetischer Ionen, verwendet werden. Als Kristall-

struktur wird die Bildung von Magnetit bevorzugt. Der Magnetitkristall kann dabei zum einen sekundär entstehen, z. B. wenn bei der Herstellung zunächst die Hydroxide entstehen, oder der Magnetitkristall kann auch zu anderen Kristallen weiterreagieren, so z. B. bei der Oxidation von Magnetit zum Maghäm. Die besondere Qualität der Nanopartikel als Kontrastmittel für die MRT, erfordert superparamagnetische magnetische Eigenschaften. Superparamagnetismus kann nur in Festkörpern vorkommen, so daß als weitere Eigenschaft gefordert wird, daß die Kristalle Festkörpereigenschaften haben, also partikuläre Kristalle sind. Als Minimal-Eisenanteil müssen mindestens 50 Eisenatome (bzw. Metallatome) pro Kristall enthalten sein. Die Größe der Eisen enthaltenden Kerne kann durch Variation bei der Synthese über weite Bereiche gesteuert werden (1- ca. 30 nm), bevorzugt ist aber die Synthese kleiner Kerne mit Durchmessern kleiner 15 nm, wobei die Partikelgrößenverteilung so liegt, daß mindestens 90 % der Partikel im Bereich $0,7 \cdot \text{MW}$ bis $1,3 \cdot \text{MW}$ (MW gleich mittlerer Durchmesser, bestimmt durch Elektronenmikroskopie) sind.

Einer der besonderen Vorteile des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens ist die große Flexibilität bei der Wahl des Synthesepolymers, wobei der Begriff des "Polymers" hier nicht wörtlich zu nehmen ist, da sowohl niedermolekulare Substanzen als auch Mischungen nieder- mit höhermolekularen Substanzen zur Herstellung der Eisen enthaltenden Kerne verwendet werden können. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von nieder- oder höhermolekularen Substanzen, die negative Ladungsträger im Molekül enthalten. Bevorzugt sind hier Carboxylate oder Analoga, Phosphate (oder andere P enthaltende Gruppen) und Sulfate (oder andere S enthaltende Gruppen). Diese Derivate können dabei lediglich eine einzige funktionelle Gruppe tragen oder auch mehrere der

funktionellen Gruppen enthalten. Die zugrundeliegende Theorie geht davon aus, daß die Affinität zur Oberfläche des Eisen enthaltenden Kerns durch Wechselwirkung zwischen positiver Eisenoxidoberfläche und negativer Ladung im Synthesepolymer erfolgt. Enthält das Synthesepolymer mehrere der Gruppen, so ist die Wechselwirkung besonders ausgeprägt ("Multi-Side-Attachement"). Einige besonders geeignete Klassen für die Stabilisierung während der Synthese sind:

- 10 Niedermolekulare Substanzen, wie z. B. Carboxypolyalkohole, Polycarboxypolyalkohole, Polycarboxyalkohole, Carboxyalkohole, Alkohole, Monozucker, Oligomere Zucker und synthetische Polymere, wie z. B. Polyethylenglycol, Polypropylenglycol und Mischungen (Block und Copolymere),
- 15 Polyacrylsäure, Polyvinylalkohol, Polymilchsäure (Polylactide und Polylactid-Glycid), sowie natürliche oder insbesondere partialsynthetische oder chemisch und/oder enzymatisch modifizierte natürliche Polymere wie z. B. Dextrane und Derivate, Arabinsäure, Glycosaminoglycane und synthetische Analoga, Stärke und Derivate
- 20 sowie Gelatinederivate.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung niedermolekularer Dextranderivate, die negative Ladungsträger enthalten.

- 25 Ein Beispiel ist hier (Mono-)Carboxydextran; die Herstellung ist z. B. bei Bremner et al. [Bremner, I.; Cox, JSG; Moss, GF; Carbohydrate Research 11; 77-84; 1969] beschrieben und ein anderes bevorzugtes Beispiel ist die Verwendung von Polycarboxydextran, daß durch Ether-
- 30 bindung zwischen 6-Bromhexansäure und den Hydroxylgruppen des Dextrans hergestellt werden kann. [Noguchi, A.; Takahashi, T; Yamaguchi, T.; Kitamura, Y.; Takakura, T.; Hashida, M.; Sezaki, H.; Bioconjugate chemistry 3; 132-137; 1992]. Das Polycarboxydextran kann durch die vielen
- 35 negativen Ladungen über ein "Multi-Side-Attachement" mit der Eisenoxidoberfläche wechselwirken.

Die Menge an Synthesepolymer zur Stabilisierung während der Herstellung beträgt das 0,5-20 fache des Gewichtes der Summe der im Ansatz enthaltenden Metallionen, wobei
5 der Gesamtanteil im Reaktionsgemisch so gewählt wird, daß die Viskosität bei Verwendung polymerer Synthesepolymere noch eine gute Durchmischung des Ansatzes erlaubt ($< 50 \text{ \% g/V}$). Bevorzugt ist die Verwendung eines etwa 3-15fachen Überschusses (Gewicht) an Synthesepolymer gegenüber der
10 Summe der enthaltenen Metallionen.

Nach der Herstellung der Rohsubstanz erfolgt die Reduktion des Anteils an Synthesepolymer im Ansatz durch ein Desorptionsverfahren. Zur Desorption können chromatographische Verfahren, ein Verfahren aus dem Bereich der
15 Magnetseparationstechnik, eine Dialyse, eine Zentrifugation oder Ultrazentrifugation, eine Ultrafiltration oder andere geeignete Verfahren verwendet werden. Die Desorption kann durch die Anwendung erhöhter Temperatur in Kombination mit einem der Desorptionsverfahren
20 angewandt werden. Eine weitere Möglichkeit Einfluß auf das Ausmaß der Desorption zu nehmen ist die Verwendung desorbierender Substanzen, wie z. B. von Pufferlösungen oder Tensiden.

25 Nach der Desorption der Rohsubstanz erhält man eine stabile, physikalisch optimale Lösung/Suspension, die den Grundbaustein für die Herstellung der spezifischen Nanopartikel darstellt. Die Grundbausteine bestehen aus dem Eisen enthaltenden Kern und dem (Rest-) Synthesepolymer. Die Menge an verbliebenem Synthesepolymer beträgt,
30 je nach dem durch das Desorptionsverfahren eingestellte Verhältnis, 0,01 bis 1. Bevorzugt ist der Bereich von 0,25 bis 0,75, da in diesem Bereich der beste Kompromiß aus Stabilität und Adsorptionsfähigkeit des Grundbausteins resultiert. Die Gesamtgröße (hydrodynamischer
35 Durchmesser) des Grundbausteins variiert in Abhängigkeit

von der Größe des Eisen-enthaltenden Kerns und dem verwendeten Synthesepolymer und liegt in der Größenordnung kleiner 100 nm, vorzugsweise kleiner 50 nm. Besonders bevorzugt ist die Herstellung von Grundbausteinen, bei denen der Gesamtdurchmesser höchstens fünfmal so groß ist wie der Kerndurchmesser.

Der Grundbaustein wird mit einem Targetpolymer zum fertigen Nanopartikel kombiniert. Das adsorbierte Targetpolymer bildet um das Synthesepolymer/Eisen-enthaltender Kern eine Sekundärhülle und bildet die Oberfläche des Gesamtsystems und bestimmt, neben dem partikulären Charakter der Partikel, das In-vivo-Verhalten. Der besondere Vorteil des Herstellungsverfahrens liegt darin, daß praktisch jede Substanz, die an den Grundbaustein adsorbiert werden kann, zur biologischen Steuerung der Nanopartikel verwendbar ist. Die Targetpolymere unterliegen keinem Synthesestreß, so daß auch empfindliche und bisher nicht verwendbare Substanzen als Leitmoleküle zur Steuerung des biologischen Verhaltens verwendet werden können.

Beispiele für geeignete Targetpolymere sind u. a.:

Natürliche Oligo- und Polysaccharide wie Dextran mit Molekulargewichten kleiner als 100.000, Mischungen verschiedener Dextrane, Dextrane unterschiedlicher Herkunft, besonders gereinigtes Dextran (FP = free pyrogen Qualität), Fucoidan, Arabinogalactan, Chondroitin und -sulfate, Dermatan, Heparin, Heparitin, Hyaluronsäure, Keratan, Polygalacturonsäure, Polyglucuronsäure, Polymannuronsäure, Inulin, Polylactose, Polylactosamin, Polyinosinsäure, Polysucrose, Amylose, Amylopektin, Glycogen, Glucan, Nigeran, Pullulan, Irisin, Asparagosin, Sinistrin, Tricitin, Kritesin, Graminin, Sitosin,

Lichenin, Isolichenan, Galactan, Galactocaolose, Luteose, Mannane, Mannocarolose, Pustulan, Laminarin, Xanthan, Xylan und Copolymere, Araboxylan, Arabogalaktan, Araban, Lävane (Fructosane), Teichinsäure, Blutgruppenpoly-
5 saccharide, Guaran, Carubin, Alfalfa, Glucomannane, Galactoglucomannane, Phosphomannane, Fucane, Pektine, Cyclo-Dextrine, Alginsäure, Traganth und andere Gummisorten, Chitin, Chitosan, Agar, Furcellaran, Carrageen, Cellulose, Celluronsäure, Arabinsäure und die chemisch
10 und/oder enzymatisch hergestellten Derivate, die ggf. noch beliebig substituiert sein können und die niedermolekularen Abbauprodukte der hochmolekularen Verbindungen. Ebenso geeignet sind die Polyamino- und Pseudopolyaminosäuren.

15

Synthetische Oligomere und Polymere wie Polyethylen-
glycol; Polypropylenglycol, Polyoxyethylenether, Polyanetholsulfonsäure, Polyethylenimin, Polymaleimid, Polyvinylalkohol, Polyvinylchlorid, Polyvinylacetat,
20 Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylsulfat, Polyacrylsäure, Polymethacrylsäure, Polylactid, Polylactid-glycid.

Monomere bis oligomere Zucker und verwandte Substanzen wie Aldo- und Ketotriosen bis Aldo- und Ketoheptosen,
25 Ketooktosen und Ketononosen, Anhydrozucker, Monocarbonsäuren und Derivate mit 5 oder 6 Kohlenstoffatomen in der Hauptkette, Cyclite, Amino- und Diaminozucker, Desoxyzucker, Aminodesoxyzucker und Amino- und Diaminozucker-carbonsäuren, Aminocyclite, Phosphor enthaltende Derivate der Mono- bis
30 Oligomere.

Oligomere/Polymere mit antitumoralen Eigenschaften (höhere Pflanzen, Pilze, Flechten und Bakterien) wie Lipopolysaccharide, β -2,6-Fructan, β -1,3-Glucan, Manno-

glucan, Mannan, Glucomannan, β -1,3/1,6-Glucane, β -1,6-Glucan, β -1,3/1,4-Glucan, Arabinoxylan, Hemicellulose, β -1,4-Xylan, Arabinoglucan, Arabinogalactan, Arabinofucoglucan, α -1,6/1,3-Glucan, α -1,5-Arabinan, α -1,6-Glucan, β -2,1/2,6-Fructan, β -2,1-Fructan .

Eine wesentliche Voraussetzung für die Wirkung der Antitumorpholysaccharide ist die Wasserlöslichkeit, die bei den β -1,3/1,6-Glucanen durch Verzweigungen in Position 6 gewährleistet ist. Bei wasserunlöslichen Polysacchariden läßt sich durch die Einführung hydrophiler und gut hydratisierter Gruppen die Löslichkeit verbessern. Als Substituenten können u. a. Methyl-, Ethyl-, Acetyl-, Carboxymethyl- oder Sulfatgruppen verwendet werden.

Tenside und oberflächenaktive Substanzen wie Niotenside, Alkylglucoside, Glucamide, Alkylmaltoside, mono- und polydisperses Polyoxyethylen, Quartäre Ammoniumsalze, Gallensäuren, Alkylsulfate, Betaine, CHAP-Derivate.

Beispielhaft und um die Vielzahl der verwendbaren Steuerungsmöglichkeiten aufzuzeigen und damit auch die Vorzüge des modularen Systems zu demonstrieren, können die Moleküle zur Steuerung des In-vivo-Verhaltens (Spezifität) auch Zellfragmente, Zellen, Bakterienfragmente, Substanzen aus der großen Gruppe der Lectine, der Hormone und Mediatorsubstanzen, der Proteine und Neoproteine, der Peptide und Polypeptide, der Antikörper, Antikörperfragmenten oder den "molecular recognition units", der Integrine (ELAM, LECAM, VCAM usw.) oder Rezeptor-spezifischen Substanzen (z. B. Lewis-X, Sialyl-Lewis-X usw.) sein. Ferner gehören dazu die Vielzahl der Blut-/ Plasma-/Serumbestandteile und der Opsonine, der Gruppe der Oligonukleotide und synthetischen Oligo-

nukleotide, DNA und RNA oder deren Derivate oder
Fragmente oder Analoga und Homologe, aus der Gruppe der
Lipopolysaccharide, Lipoproteine, Glycerinester,
Cholesterine- und Ester, stammen, oder auch Metabolite
5 und Antimetabolite, Arzneistoffe, Arzneistoffkonjugate,
Chemotherapeutika und Zytostatika.

Als Targetpolymere können zusätzlich oder statt der o. g.
Beispiele für Targetpolymere auch die chemischen und/oder
10 enzymatisch hergestellten Derivate oder Abbauprodukte
verwendet werden.

Die Derivate oder die "nativen" Targetpolymere können
zusätzlich funktionelle Gruppen tragen. Diese funktionel-
len Gruppen können an einem Ende oder an beiden Enden
15 oder an beliebiger Stelle im zugrundeliegenden Targetmo-
lekül sein. Dabei können die funktionellen Gruppen alle
gleich oder aber auch unterschiedliche Gruppen miteinan-
der kombiniert sein. Sowohl bei den Derivaten selber als
auch bei den funktionellen Gruppen sind diejenigen, die
20 N-, S-, O- oder P-Atome, Säure- oder Analoga, Hydroxy-,
Ether- oder Estergruppen enthalten, bevorzugt.

Die genaue Zusammensetzung der Nanopartikel richtet sich
nach der jeweiligen, durch die Indikation festgelegten,
25 Anforderung. Als Targetpolymere können sowohl einzelne
Substanzen als auch beliebige Kombinationen der Targetpo-
lymere, z. B. synthetisch und nichtsynthetisch, nieder
und höhermolekular, derivatisiert und nicht-derivati-
siert, verwendet werden.

30

Eine besondere Variante der Herstellung besteht darin,
daß das Targetpolymer und das Synthesepolymer gleich sein
können. In diesem Zusammenhang heißt das, daß das Target-
polymer mit dem zur Synthese eingesetzten Polymer gleich
35 ist, da wie schon o. g. beschrieben, daß Synthesepolymer
nach der Synthese ja nicht mehr mit dem zur Synthese

eingesetzten Polymer identisch ist. Das Targetpolymer ist hier also das deklarierte Synthesepolymer, unterlag aber nicht wie dieses den drastischen Bedingungen während der Herstellung und befindet sich daher noch in "physiologischem" Zustand.

Die Mengen an Targetpolymer in der fertigen Lösung der Nanopartikel können über weite Bereiche variiert werden. Prinzipiell ist der Bereich vom 0,5- bis zum 50-fachen Gewicht der Summe des Gewichtes der enthaltenen Metallionen, verwendbar, aber bevorzugt ist die Verwendung von Mengen entsprechend dem 1 bis ca. 25-fachen.

Als Adsorptionsvermittler sind alle Stoffe aufzufassen, die die Adsorption zwischen dem Targetpolymer oder dem Gemisch der Targetpolymere an die Oberfläche des Eisenenthaltenden Kerns oder Kern plus Primärcoat, verbessern oder erst ermöglichen. Prinzipiell müssen die Adsorptionsvermittler also bifunktionelle Eigenschaften aufweisen, wobei ein Molekülteil die Affinität zum Grundbaustein beinhaltet, während ein anderer Molekülteil, der allerdings mit dem ersten funktionellen Teil identisch sein kann, die Affinität zum Targetmolekül bedingt.

Geeignet sind z. B. Stoffe mit 2 funktionellen Gruppen oder einem hydrophoben und einem hydrophilen Molekülteil. Bevorzugte Adsorptionsvermittler sind Peptide, die eine Affinität zum Eisenkern oder zum Eisenkern plus Primärcoat aufweisen. Solche Peptide lassen sich mit modernen Methoden der Biochemie in Peptid-Librarys selektieren. Bevorzugt sind Peptide, die die RRTVKHHVN oder die RRSRHH oder auch RSKRGR Sequenz oder Teile davon im Molekül enthalten [Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren s. z. B. Stryer, Biochemistry; Freeman and Comp.; New York; 1988]

Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung der Peptide als Adsorptionsvermittler ist, daß der nicht zur Affinität

benötigte Molekülteil auch mit üblichen Methoden der Biochemie kovalent an das oder die Targetpolymere gekoppelt werden kann, so daß hier die Affinität zum Targetpolymer nur optional vorhanden sein muß. Die Menge an Adsorptionsvermittler hängt von der oder den Eigenschaften der verwendeten Substanzen (Stärke der Adsorptionsvermittlung) und von den Eigenschaften des oder der Targetpolymere ab; der maximale Zusatz ist allerdings kleiner oder höchstens gleich dem Gewicht der Summe der im Kern enthaltenen Metallionen.

Pharmazeutische Hilfsstoffe, die in den Lösungen der Nanopartikel enthalten sein können, lassen sich nach ihrer Aufgabe den Klassen Konservierungsmittel, pH-Stabilisatoren, Antioxidantien, Isotonisierungszusätze, Pепtisolatoren und Lösungsvermittler zuordnen. Als weitere Hilfsstoffe können medizinisch tolerable Lösungsmittel wie Zuckerlösungen, Plasmaexpander, Elektrolytlösungen, physiologische Kochsalzlösung oder auch Wasser ad injectionem, sowie parenteral applizierbare ölige "Lösungsmittel" verwendet werden.

Exemplarische Beispiele für Pharmaka, die in den Lösungen der Nanopartikel enthalten sein können, lassen sich den Gruppen Antiallergika, Antianaphylaktika oder Prophylaktika, den Vasodilatoren oder Vasokonstriktoren, den Stoffen mit Einfluß auf die Durchblutung, den Stoffen, die den Metabolismus der Nanopartikel beeinflussen, den Stoffen, die die Pharmakokinetik der Nanopartikel beeinflussen, den Stoffen, die die Eisenbilanz verändern, den Stoffen aus dem Bereich der Enzyminduktoren und Inhibitoren, oder allgemein den Mediatoren und Antimediatoren, zuordnen. Für die Verwendung in der Therapie sind hauptsächlich Arzneistoffe aus den Gruppen Zytostatika, Chemoptherapeutika, der Hormone und Antidiabetika von besonderem Interesse.

Die Pharmaka können den Lösungen der Nanopartikel dabei als optionale Komponente zusätzlich zugesetzt sein oder aber auch an die Targetpolymere gebunden und dann das Polymer-Arzneistoff-Konjugat als Targetpolymer verwendet werden.

Das "physiologische" Verteilungsverhalten der Nanopartikel läßt sich nicht nur über die Beeinflussung "physiologischer" Faktoren, wie Durchblutung, Lymphfluß und Lymphproduktion o. ä. durch Pharmaka verändern, sondern die in vivo Verteilung kann auch durch einfache physiotherapeutische Maßnahmen verändert werden. Besonders hervorzuheben sind hier die Bewegung, die z. B. durch einen Spaziergang oder Übungen auf dem Ergometer gezielt "appliziert" werden kann und entgegengesetzt dazu die Bewegungslosigkeit, wie z. B. bei bettlägerigen Patienten und oder die Anwendung in Narkose o. ä. die zu einem völlig anderen Verteilungsverhalten und -muster führt. Zum anderen ist insbesondere die Zufuhr von Wärme, die sich durch einfache Anwendung von Rotlicht oder Ganz- bzw. Teilkörperbädern, ermöglichen läßt, zu erwähnen. Besonders bevorzugt ist hier die Wärmezufuhr durch eine Hyperthermie-Vorrichtung, wie sie in vielen Kliniken zur gezielten Wärmezufuhr in der adjuvanten Tumorthherapie verwendet wird. Durch gezielte lokale Erwärmung läßt sich die "Selektivität" durch physiotherapeutische Begleitung verbessern.

Die hohe Flexibilität der modularen Herstellung erlaubt die freie Kombination von Targetpolymer(en), Adsorptionsvermittler(n), pharmazeutischen Hilfsstoffen und Pharmaka sowie die Anwendung beliebiger Zusammensetzungen der Nanopartikel in Kombination mit physiotherapeutischen Maßnahmen.

Die Nanopartikel bzw. die Lösungen können aus vielen unterschiedlichen Bestandteilen zusammengesetzt sein, so daß nur allgemeine Aussagen zur exakten Zusammensetzung, die sich nach der jeweiligen Anwendung richtet, gegeben werden können:

Tab. 2: Prozentuale bzw. Mengenzusammensetzung der erfindungsgemäßen Nanopartikel

		relativer Anteil (Gewicht)	
Grundbau- stein	Eisen	= 1	Summe = 1
	Dotierung mit anderen Metallen	≤ 0,25	
	Synthesepolymer(e)		0,01-1
	Adsorptionsvermittler		≤ 1
	Targetpolymer(e)		0,5 - 50
	Pharmaka	wie erforderlich	
	pharmazeutische Hilfsstoffe	wie erforderlich	

10

Der Gesamtdurchmesser der Nanopartikel inklusive aller Zusatzstoffe ist höchstens zehnmal höher (gemessen durch ein Laserlichtstreuverfahren, PCS) als der Durchmesser des Eisen enthaltenden Kerns (gemessen durch Elektronenmikroskopie in Transmissionsanordnung; TEM). Bevorzugt sind die Kombinationen, bei denen der Durchmesser des Grundbausteins (Kern + Primärhülle) durch das Target-

15

polymer oder die Kombination Targetpolymer und optionale Zusätze nur unwesentlich erhöht wird, der mit PCS gemessene Durchmesser soll maximal 20 % über dem Durchmesser des Grundbausteins liegen.

5

Durch die Kombination optimaler physikalischer Eigenschaften der Grundbausteine mit einer Vielzahl möglicher Targetpolymere lassen sich Nanopartikel mit bisher unerreichter Flexibilität und Qualität für Anwendungen, die hohe biologische Spezifität und hohe physikalische Qualität (z. B. Partikelgröße, magnetische Eigenschaften) erfordern, herstellen. Durch die modulare Bauweise und die damit verbundenen vielen Kombinationsmöglichkeiten ergibt sich ein breites Spektrum möglicher Anwendungen:

15

Aufgrund ihrer hohen physikalischen Qualität und der besonders guten Steuerungsfähigkeit ("targetability") der Nanopartikel durch flexible Anpassung (modularer Aufbau) des Targetpolymers (Sekundärcoat) an die jeweilige Fragestellung, ergeben sich viele Einsatzbereiche für spezielle Indikationen wie die MR-Lymphographie nach intravenöser oder lokaler interstitieller Gabe, die Tumordarstellung, die Darstellung von Funktionen oder gestörten Funktionen, die Plaque-Darstellung (Atherosklerose-Imaging), die Darstellung von Thromben und Gefäßverschlüssen, die MR-Angiographie, Perfusionsuntersuchungen, die Darstellung von Infarkten, die Darstellung von Endothelschädigungen, das Rezeptor-Imaging, die Darstellung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke usw. und für die Differentialdiagnose, insbesondere zur Unterscheidung von Tumoren/Metastasen und hyperplastischem Gewebe.

20

25

30

35

Die Partikel eignen sich durch die außerordentliche Flexibilität bei der Herstellung auch für die unterschiedlichsten Einsatzgebiete in der In-vitro-Diagnostik,

so z. B. als spezifische Träger bei der Magnetseparationstechnik in EIA's (Enzym-Immuno-Assays).

Eine Kombination von In-vitro-Verfahren mit einem therapeutischen Ansatz ist die selektive Depletierung spezifischer Faktoren aus dem Blut ("Ex-vivo-Blutwäsche").

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel weisen eine hohe Eigenfärbung auf und durch die Kombination mit einem Targetpolymer, das zu besonders hoher Akkumulation in den Lymphknoten führt, eignen sich die Partikel hervorragend als intraoperative Markersubstanzen zum Lymphknotenstaining. Bei vielen chirurgischen Tumorentfernungen werden die Lymphknoten mit entfernt und die Vorabapplikation der Nanopartikel erleichtert es dem Operateur erheblich, die z. T. äußerst kleinen Lymphknoten im umgebenden Gewebe zu identifizieren. Die Nanopartikel weisen für diese Indikation ein besonders breites nutzbares Zeitfenster auf und können von ca. 60 min bis mehr als 24 Stunden vor Operationsbeginn appliziert werden.

20

Neben der visuellen Darstellung von Lymphknoten ergibt sich bei intratumoraler Applikation oder Applikation in die Tumorperipherie die Möglichkeit, zum einen die Tumorperipherie anzufärben und damit die Abgrenzbarkeit des Tumors zum umgebenden Gewebe zu erhöhen und zum anderen werden die Partikel aus dem Tumorareal über die gleichen entsorgenden Lymphgefäße abtransportiert, über die auch der Tumor metastasieren würde. Die Nanopartikel zeigen also die für eine Metastasierung besonders prädestinierten Lymphwege bzw. Lymphknoten auf.

30

Neben der Verwendung als intravenöses Kontrastmittel können die Partikel auch lokal appliziert werden. Die lokale Anwendung kann z. B. bei einem Mammakarzinom vorteilhaft sein, da nur ein begrenztes Gebiet dargestellt werden soll und durch die zielgerichtete Anwendung werden einerseits hohe Konzentrationen des Kontrastmit-

35

tels im Zielgebiet deponiert und zum anderen wird der restliche Organismus nicht belastet. Die indirekte gezielte Applikation ins Interstitium der Umgebung bestimmter Lymphknoten kann auch erforderlich sein, um
5 eine Diagnose zu erhärten, falls sich nach intravenöser Gabe ein verdächtiger aber unsicherer Befund ergeben hat.

Ein weiteres Anwendungsgebiet der Nanopartikel ist die Verwendung als Verstärkersubstanz in der In-vivo-
10 Diagnostik auf der Basis hochempfindlicher Meßmethoden (SQUID) zur Messung der Magnetisierung oder magnetischer Felder/Flußdichten. Die Entwicklung hoch empfindlicher Meßmethoden auf diesem Gebiet hat die Verfolgung magnetischer Partikel in vivo möglich gemacht, so daß, ähnlich
15 wie in der Szintigraphie mit radioaktiven Substanzen, magnetische Partikel zur Diagnostik von Funktionsstörungen und Läsionen herangezogen werden können.

In der Therapie lassen sich die Partikel als Arzneistoff-
20 träger verwenden. Die Spezifität der Nanopartikel wird zum Transport von Arzneistoffen an den Wirkort ausgenutzt. Die Arzneistoffe können dabei in den Eisenenthaltenden Kern inkorporiert sein, auf der Oberfläche adsorbiert werden oder aber auch chemisch an das Synthesepolymer und /oder das Targetpolymer gebunden sein. Eine
25 Alternative ist die Adsorption von Arzneistoff-Polymerkonjugaten oder Arzneistoffe an Adsorptionsvermittler zu binden, so sind z. B. bestimmte Peptidsequenzen mit hoher Adsorption an Eisenoxidoberflächen herstellbar.

30 Eine mögliche Indikation ist hier auch die Anreicherung hoher Konzentrationen von niedermolekularen Chemotherapeutika in phagozytierenden Zellen, wie es z. B. bei vielen Krankheiten mit in RES Zellen persistierenden Mikroorganismen therapeutisch erforderlich ist. Bei allen
35 therapeutischen Ansätzen können die Nanopartikel-Arzneistoff-Systeme auch durch externe Magnetfelder selektiv im

Zielgebiet akkumuliert werden. Bei speziellen Fragestellungen besteht auch die Möglichkeit, kleine Magnete zur Steuerung im Zielgebiet, z. B. in einem Tumorareal, zu implantieren.

5

Neben einer Verwendung der Nanopartikel als Träger für den gezielten Transport von Arzneistoffen in bestimmte Gewebe, lassen sich Arzneiformen mit modifizierter Wirkstofffreisetzung herstellen. Die Freisetzung des Wirkstoffs kann dabei durch biologisch spaltbare Arzneistoff-Konjugate gesteuert werden oder durch die Einlagerung des Arzneistoffs in verschiedene Komponenten des Nanopartikels mit unterschiedlichem Bioabbau erfolgen. Eine mögliche Indikation ist z. B. die Verwendung der Nanopartikel als Depotarzneiform für die Verabreichung von Hormonen.

10

15

Auch der Einsatz in neuen therapeutischen Systemen, bei denen die Freisetzung des Arzneistoffs über die magnetischen Eigenschaften der Nanopartikel über einen "magnetischen Schalter" der z. B. auch extern geregelt werden kann, induziert und gesteuert wird, ist denkbar. Eine wichtige Indikation ist hier die Entwicklung therapeutischer Systeme mit der regulierbaren Freisetzung von Antidiabetika für die Behandlung des Diabetes mellitus.

20

25

Als Arzneistoffe, die sich mit den Nanopartikeln gezielt zum Wirkort transportieren lassen, kommen insbesondere Chemotherapeutika und Zytostatika in Betracht. Auch die antimikrobielle Therapie erfordert oft den gezielten Transport des Arzneistoffs zum Wirkort (z. B. Tuberkulose, in Makrophagen persistierende Mikroorganismen). Als Arzneistoffe für therapeutische Systeme, bei denen die Freisetzung über die magnetischen Eigenschaften der Nanopartikel erfolgt, kommen neben anderen insbesondere

30

Antimikrobiotika, Hormone, Antidiabetika, Zytostatika und Chemotherapeutika in Betracht.

Über die indirekte therapeutische Verwendung hinaus
5 lassen sich die Nanopartikel aber auch selber als
"Arzneistoff" nutzen, so z. B. als Absorber in der
Hyperthermie oder in der Mößbauer-Kernabsorptionsthera-
pie, oder bei entsprechender Dotierung mit Bor oder
Gadolinium in der Neutroneneinfang Therapie. Auch in der
10 Dotierung der Nanopartikel mit radioaktiven Elementen,
die im Kern oder auch durch Adsorption geeigneter
Moleküle mit Isotopen oder Molekülen an den Grundbaustein
erfolgen, besteht eine Möglichkeit zur Verwendung der
Nanopartikel in der medizinischen Strahlentherapie.

15 Eine bevorzugte Anwendung der Nanopartikel in der
Strahlentherapie ist beispielsweise gegeben, indem die
Nanopartikel entweder über das radioaktive Isotop ^{55}Fe
einen "Selbststrahler" enthalten oder indem die Nano-
20 partikel ein Isotop enthalten, das durch eine externe
"Aktivierung" in ein strahlendes Isotop angeregt werden
kann. Beispielsweise kann der Kern ^{157}Gd enthalten und
die externe Anregung auf Neutronen zurückgehen.

25 Eine weitere Anwendung der Nanopartikel in der Strahlen-
therapie ergibt sich durch die Möglichkeit, die
Nanopartikel im Kern, im Synthese- oder im Targetpolymer
oder auch im Adsorptionsvermittler so zu verändern, daß
Selbststrahler wie z. B. ^{123}I oder ^{125}I enthalten sind.
30 Alternativ können die Nanopartikel auch ein Isotop
enthalten, das erst durch externe Anregung in ein
strahlendes Isotop überführt wird. Ein Beispiel ist hier
z. B. die Markierung des Targetpolymers mit Iod und die
externe Anregung der Iod-K-Kante mit monoenergetischer
35 Röntgenstrahlung.

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel können auch zur Entfernung von Bakterien, Viren, Endo- und Exotoxinen aus dem Vasalraum eingesetzt werden, wobei zum einen die Wechselwirkung mit den Nanopartikeln an sich zur Inaktivierung führen kann und zum anderen die Wechselwirkung zur Erkennung der Konjugate/Adsorbate durch das RES mit nachfolgender intrazellulärer Inaktivierung, erfolgen kann.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele unter Verwendung der Abbildungen 1 bis 35 näher erläutert.

Im einzelnen zeigen:

15

Abb. 1: Schematischer Aufbau der Nanopartikel mit Eisen-enthaltendem Kern, Primärcoat (Synthesepolymer) und Sekundärcoat (Targetpolymer)

20

Abb. 2: Allgemeines Syntheseschema zur Herstellung der erfindungsgemäßen Nanopartikel

Abb. 3: FTIR-Spektrum von Mono-Carboxydextran und der Ausgangsverbindung Dextran 4

25

Abb. 4: FTIR-Spektrum von Poly-Carboxydextran und der Ausgangsverbindungen Dextran T10 und 6-Bromhexansäure

Abb. 5: MR-Aufnahmen von in Agarose-eingebetteten Rattenlymphknoten

30

Abb. 6: Quantitative Auswertung (aus Abb. 5) der relativen Signalintensitäten für SE 2000/15 in verschiedenen Lymphknoten der Ratte

Abb. 7: Quantitative Auswertung (aus Abb. 5) der relativen Signalintensitäten GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten der Ratte

35

- Abb. 8: Frontale prae- und post-Kontrast MR-Aufnahmen der Beckenregion des Kaninchens in der Protonen-Dichte gewichteten Spin-Echo-Sequenz (SE 2000/15)
- 5 Abb. 9: Frontale prae- und post-Kontrast MR-Aufnahmen der Beckenregion des Kaninchens in der Protonen-Dichte gewichteten Spin-Echo-Sequenz (SE 2000/15).
- 10 Abb. 10: Relative Signalintensitäten für SE 2000/15 in verschiedenen Lymphknoten des Kaninchens 24 h p.i.
- 15 Abb. 11: Frontale prae- und post-Kontrast MR-Aufnahmen der Beckenregion des Kaninchens in der T2*-gewichtete Gradienten-Echo-Sequenz (GE 135/15/15°)
- 20 Abb. 12: Frontale prae- und post-Kontrast MR-Aufnahmen der Beckenregion des Kaninchens in der T2*-gewichteten Gradienten-Echo-Sequenz (GE 135/15/15°).
- 25 Abb. 13: Modifizierte Charge vs Originalsubstanz: Relative Signalintensitäten für GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten des Kaninchens 24 h p.i.
- 30 Abb. 14: Ex vivo MR-Aufnahmen (GE-Sequenz) von Agarose-eingebetteten Lymphknoten des Kaninchens
- 35 Abb. 15: Relative Signalintensitäten für GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten des Kaninchens 24 h p.i.
- Abb. 16: Relative Signalintensitäten in Abhängigkeit der applizierten Dosis für SE 2000/15 in verschiedenen Lymphknoten der Ratte 24 h nach Applikation der Nanopartikel.
- Abb. 17: Relative Signalintensitäten in Abhängigkeit der applizierten Dosis für GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten der Ratte 24 h nach Applikation der Nanopartikel.

- Abb. 18: Relative Signalintensitäten für SE 2000/15 in verschiedenen Lymphknoten der Ratte in Abhängigkeit der Zeit nach Applikation (Vergleichssubstanz)
- 5 Abb. 19: Relative Signalintensitäten für SE 2000/15 in verschiedenen Lymphknoten der Ratte in Abhängigkeit der Zeit nach Applikation der spezifischen Nanopartikel.
- 10 Abb. 20: Relative Signalintensitäten für GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten der Ratte in Abhängigkeit der Zeit nach Applikation (Vergleichssubstanz).
- 15 Abb. 21: Relative Signalintensitäten für GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten der Ratte in Abhängigkeit der Zeit nach Applikation der spezifischen Nanopartikel.
- Abb. 22: Beeinflussung der Lymphknotenanreicherung durch gezielte Applikation von Wärme.
- 20 Abb. 23 : Transversale Dynamik-Studie des Rattenabdomens mit einer T1-gewichteten SE Sequenz (TR: 200 ms, TE: 10 ms) nach Bolus-Injektion der spezifischen Nanopartikel nach Beispiel D2 (Dosis 20 µmol Fe/kg)
- 25 Abb. 24: Vergleich der relativen Signalintensitäten für SE TR/TE 200ms/10ms im venösen Gefäß und dem Leberparenchym für die spezifischen Nanopartikel nach Beispiel D2 und die unspezifische Vergleichssubstanz nach Beispiel C2
- 30 Abb. 25: Koronare MIPS (maximum-intensity projections) von 3D-Flash-Aufnahmen (TR: 40 ms, TE: 6 ms, FA 60 °) für die spezifischen Nanopartikel nach Beispiel D2 und die Vergleichssubstanz C2
- 35 Abb. 26: Erfindungsgemäße Nanopartikel als "intraoperative" Markersubstanzen für die visuelle Detektion von Lymphknoten (Übersichtsaufnahme)

- Abb. 27: Erfindungsgemäße Nanopartikel als "intraoperative" Markersubstanzen für die visuelle Detektion von Lymphknoten (Detailansicht).
- 5 Abb. 28: Demonstration von Metastasen in Lymphknoten durch visuelle Detektion in metastatischen Lymphknoten am Kaninchen.
- Abb. 29: Zellaufnahme von spezifischen Nanopartikeln (mit Transferrin) im Vergleich zur unspezifischen Kontrolle (Nanopartikel ohne Transferrin).
- 10
- Abb. 30: Ex vivo MR-tomographische Darstellung atherosklerotischer Plaques der Aorta eines Kaninchens mit der Modifikation zu den Nanopartikeln nach Beispiel D7 (Dosis 200 μmol Fe/kg; Resektion der Aorta 5 h p.i.)
- 15
- Abb. 31: Histologischer Eisen-Nachweis in der atherosklerotischen Membran der Kaninchen-Aorta mit Berliner-Blau-Färbung.
- 20
- Abb. 32: Histochemische Detektion (Berliner Blau Färbung) der akkumulierten Nanopartikel nach Beispiel D7 in der Aorta eines Watanabe Kaninchens.
- Abb. 33: Transversale T1-gewichtete Spin-Echo Dynamik-Studie (TR: 300 ms, TE: 15 ms) des tumoralen Signalverhaltens nach Bolusinjektion von Nanopartikeln nach Beispiel D2 (200 μmol Fe/kg)
- 25
- Abb. 34: Verlauf der relativen Signalintensität (Anreicherung) im Tumor.
- 30
- Abb. 35: Zeitabhängige transversale Protonen-Dichtegewichtete (SE 2000/15) Aufnahmen nach Applikation der Nanopartikel nach Beispiel D2 (200 μmol Fe/kg).

Beispiele**zur Herstellung und zur Anwendung****A: Herstellung von Synthesepolymeren**

5

A1 Synthese von (Mono-)Carboxydextran (CDx)

100 g Dextran 4 werden in 500 ml Wasser gelöst und auf 60 °C erhitzt. Unter Rühren erfolgt die Zugabe von ungefähr 55 ml ca. 10 N Natronlauge. Nach 5 Stunden Reaktionszeit erfolgt die (teilweise) Neutralisation der Lösung auf pH 8. Die braune Lösung wird anschließend über einen Mischbett-Ionenaustauscher gereinigt. Die Fraktionen mit sauren Eigenschaften werden gepoolt und am Rotationsverdampfer bei 40 °C im Vakuum aufkonzentriert. Anschließend erfolgt die Gefriertrocknung.

Tab. 3: analytische Daten:

	Dimension	Ergebnis	Methode
Molekulargewicht	g/Mol	ca. 2.000	Ausschluß-Chromatographie
Säuregehalt (%)	%	7,3 ± 0,4	Potentiometrische Titration
pKs-Carbonsäure		3,6 - 3,8	Potentiometrische Titration
optische Drehung (Wasser)	(Grad)	+ 156,9 ° ± 9,9 °	Kreispolarmeter (Zeiss)
Ausbeute	%	59	Anthron-Methode
Elementaranalyse	%		
Wasser		0,70	
Kohlenstoff		41,25	
Wasserstoff		6,30	

Das FTIR-Spektrum (Kaliumbromid) des modifizierten Dextrans (=Carboxydextran) ist in Abbildung 3 dargestellt.

A2 Synthese von Polycarboxydextran (P-CDx)

- 5 10 g Dextran T10 werden in einen 250 ml 2-Hals-Kolben eingewogen und mit 100 ml 4 N NaOH versetzt. Der eine Hals des Kolbens wird mit einem Rückflußkühler ausgestattet und die Lösung dann auf ca. 80 °C erhitzt. Unter Rühren (Magnetrührer) erfolgt durch den zweiten Zugang
- 10 die portionsweise Zugabe von 30 g 6-Bromhexansäure. Nach der Zugabe wird der Zugang durch einen Stopfen verschlossen und das Reaktionsgemisch für 3 Stunden weitergerührt. Nach der Reaktion erfolgt unter einem Abzug die Neutralisation mit 6 N HCl und dann eine Vorkonzentration am
- 15 Rotationsverdampfer (60 °C, Vakuum). Die Abtrennung des nicht umgesetzten Reagenzes bzw. die Reinigung des modifizierten Carboxydextrans erfolgt durch Fällung mit Ethanol. Der weiße Niederschlag wird gewaschen, in Aqua bidest. wieder aufgelöst und abschließend durch 0,22 µm
- 20 Filter filtriert und lyophilisiert.

Tab. 4: analytische Daten

	Dimension	Ergebnis	Methode
Molekulargewicht	g/Mol	ca. 12.000	Ausschluß-Chromatographie
Säuregehalt (%)	%	19,86 ± 1,2	Potentiometrische Titration
pKs-Carbonsäure		4,4 - 4,8	Potentiometrische Titration
optische Drehung (Wasser)	(Grad)	+ 109,3 ° ± 6,9 °	Kreispolarmeter (Zeiss)
Ausbeute	%	95	Anthron-Methode
Elementaranalyse	%		

Wasser		2,3	
Kohlenstoff		49,7	
Wasserstoff		5,4	

Das FTIR-Spektrum des Poly-Carboxydextrans ist in Abbildung 4 abgebildet.

B: Herstellung der Rohsubstanzen

5 B1 Herstellung aus CDx mit Ammoniak-Gas

5,0 g Mono-Carboxydextran (CDx, Beispiel A1) mit einem Molekulargewicht von ca. 2000 Da werden in 17,5 ml Aqua bidest. gelöst. Die Lösung wird durch einblasen von Stickstoff entgast. In einem Reagenzglas werden 6,7 ml 1 molare Eisen-III-chlorid-hexahydrat-Lösung vorgelegt und mit Stickstoff entgast. Zur Eisen-III-Lösung werden 648 mg Eisen-II-chlorid-tetrahydrat gegeben und im Stickstoffstrom gelöst. Die Polymer-Lösung wird auf ca. 75 °C erwärmt und die Eisenlösung zugegeben (unter Stickstoffbegasung). Das Reaktionsgemisch wird in der Wärme unter guter Durchmischung durch schnelles Einleiten von Ammoniak aus einer Gasflasche alkalisch gestellt. Anschließend wird die Reaktionslösung etwa 1 Stunde unter Rückflußbedingungen erhitzt. Anschließend wird noch für ca. 10 Minuten am offenen Kolben erhitzt, um den nicht umgesetzten Ammoniak auszutreiben. Nach dem Abkühlen wird für 30 min bei 2500 g zentrifugiert und das Filtrat am Rotationsverdampfer auf etwa 7 ml eingeeengt, der pH-Wert kontrolliert und ggf. neutralisiert und nach der Konzentrationsbestimmung mit Aqua bidest. auf eine etwa 1 molare Eisenkonzentration eingestellt sowie anschließend 0,22 µm filtriert. Die Lösung kann in einem Autoklaven mit gespanntem Wasserdampf (Verfahren A121) sterilisiert werden.

Tab. 5: analytische Daten:

	Dimension	Ergebnis	Bemerkung
Gehaltsangaben			
Ausbeute (Eisen)	%	87	
Gehalt (Eisen)	Mol/l	1	ICP- Atomemissionsspektroskopie
Eisen- II/Gesamteisen	%	9,8	Phenanthrolin-Methode
Polymer (C- Dextran)	mg/ml	500	Anthron-Methode
Polymer/Eisen:	(g/g)	9:1	
Größenangaben			
Kerndurchmesser	nm \pm SD	3,8 \pm 0,8	Elektronenmikroskop (TEM)
Gesamtdurchmesser	nm \pm SD	9,9 \pm 6,1	Laserlichtstreuung (PCS)
	nm	11,1	Ausschluß-Chromatographie
Relaxivität und Suszeptibilität			
Suszeptibilität	EMU/g	64	Magnetische Waage
T1-Relaxivität	l mmol ⁻¹ s ⁻¹	54	ICP- Atomemissionsspektroskopie
T2-Relaxivität	l mmol ⁻¹ s ⁻¹	24	ICP- Atomemissionsspektroskopie
Bluthalbwertszeit (200 μ mol/kg KGW, Ratte, n=5)	min	88	(T1) ¹
		94	(T2) ²
		101	(Fe) ³

Anmerkung 1-3: Bestimmung der Bluthalbwertszeit

•Bluteliminationshalbwertszeit

5

In Ethernarkose wird in die arteria carotis communis der Versuchstiere (Ratte, ca. 200 g) ein 50,5 cm langer mit heparinisierte Kochsalzlösung (0,2 ml) gefüllter

Katheter implantiert und etwa 1,5 cm zum Herzen vorgeschoben. Das frei bewegliche Ende des Katheters wurde nach außen geführt und mit Histoacryl fixiert. Etwa eine Stunde nach Operationsende wird die Prüfsubstanz i. v. über die Schwanzvene (ca. 1 ml/min) appliziert. Die Blutentnahmen erfolgten zu verschiedenen Zeitpunkten entsprechend den erwarteten Eliminationsgeschwindigkeiten der Probesubstanzen am wachen Tier. Nach Ende des Versuchs wurden die Tiere unter Ether-

5

10

•Halbwertszeit des T_1 - und T_2 -Effektes

Die Blutproben werden für 15 min bei 2900 rpm (1000 g) zentrifugiert und dann werden aus dem Überstand 0,250 ml abgenommen und mit bidest. Wasser auf 2,0 ml aufgefüllt und das Gemisch dann auf 40 °C temperiert.

15

Die "Konzentrationsbestimmung" erfolgt über die Messung der $T_{1,2}$ -Relaxationszeiten mit dem Relaxometer pc120 (Bruker, Deutschland). Die Messung wurde mit einer 180°-90°-IR-(Inversion Recovery)-Sequenz (T_1) bzw. mit einer CPMG-Sequenz (T_2) durchgeführt.

20

Die Auswertung wurde mit einem pharmakokinetischen Zweikompartiment-Modell vorgenommen und die Berechnung der Daten erfolgte mit Hilfe des Pharmakokinetik Computerprogramms TOPFIT, indem die Konzentrationen, ausgedrückt als reziproke $T_{1,2}$ -Zeiten (Relaxationsraten) abzüglich Leerwert, über der Zeit aufgetragen wurden. TOPFIT errechnet durch lineare Regression aus der halblogarithmischen "Konzentrations"-Zeit-Darstellung die Steigung der Geraden und daraus die Effekt-Halbwertszeiten.

25

30

•Halbwertszeit über den Eisengehalt

Von den Lösungen zur Relaxationszeitbestimmung wurden 800 µl abpipettiert, mit konzentrierter Salpetersäure aufgelöst, ad 10,0 ml mit bidest. Wasser aufgefüllt und

35

anschließend der Eisengehalt mit Atomemissionsspektroskopie (AES) quantifiziert. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren erfolgt dann die Umrechnung in Blutkonzentrationen und die Auswertung über ein Konzentrations-Zeit-Diagramm mit TOPFIT.

B2 Herstellung aus P-CDx mit NaOH und Fe-III-citrat und Fe-II-gluconat

5,0 g Poly-Carboxydextran (Beispiel A2) mit einem Molekulargewicht von ca. 12000 Da werden in 17,5 ml Aqua bidest. gelöst. Die Lösung wird durch einblasen von Stickstoff entgast. In einem Reagenzglas werden 6,7 ml 1 molare Eisen-III-citrat-monohydrat-Lösung vorgelegt und mit Stickstoff entgast. Zur Eisen-III-Lösung werden 1,635 g Eisen-II-gluconat-trihydrat gegeben und im Stickstoffstrom gelöst. Die Polymer-Lösung wird auf ca. 75 °C erwärmt und die Eisenlösung zugegeben (unter Stickstoffbegasung). Das Reaktionsgemisch wird in der Wärme unter guter Durchmischung innerhalb von 30 Sekunden mit ca. 12 ml 3 N Natronlauge versetzt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit ca. 6 N Salzsäure neutralisiert und etwa 1 Stunde unter Rückflußbedingungen erhitzt. Nach dem Abkühlen wird für 30 min bei 2500 g zentrifugiert und das Filtrat am Rotationsverdampfer auf etwa 7 ml eingeeengt, der pH-Wert kontrolliert und nach der Konzentrationsbestimmung mit Aqua bidest. auf eine etwa 1 molare Eisenkonzentration eingestellt sowie anschließend 0,22 µm filtriert. Die Lösung kann in einem Autoklaven (Verfahren A121) sterilisiert werden.

Tab. 6: analytische Daten:

	Dimension	Ergebnis	Bemerkung
Gehaltsangaben			
Ausbeute (Eisen)	%	84	

Gehalt (Eisen)	Mol/l	1	ICP- Atomemissionsspektroskopie
Eisen-II/ Gesamteisen	%	11,4	Phenanthrolin-Methode
Polymer (P- Dextran)	mg/ml	505*	Anthron-Methode
Polymer/Eisen:	(g/g)	9:1	
Größenangaben			
Kerndurchmesser	nm \pm SD	4,1 \pm 1,3	Elektronenmikroskop (TEM)
Gesamtdurch- messer	nm \pm SD nm	20,4 \pm 8,4 ca. 27	Laserlichtstreuung (PCS) Ausschluß-Chromatographie
Relaxivität und Suszeptibilität			
Suszeptibilität	EMU/g	77	Magnetische Waage
T1-Relaxivität	l mmol ⁻¹ s ⁻¹	24	ICP- Atomemissionsspektroskopie
T2-Relaxivität	l mmol ⁻¹ s ⁻¹	64	ICP- Atomemissionsspektroskopie
Bluthalbwerts- zeit (200 mmol/kg KGW, Ratte, n=5)	min	68 64 59	(T1) s. Beispiel B1 (T2) s. Beispiel B1 (Fe) s. Beispiel B1

* Der Gehalt an P-CDx errechnet sich aus den bestimmten
Glucoseäquivalenten multipliziert mit dem Faktor 1,64
(100 mg P-CDx = 61 mg Glucoseäquivalente)

5 B3 Herstellung aus CDx mit Fe-III-NTA und Ammoniumhydroxid

5,0 g (Mono-)Carboxydextran (CDx, Beispiel A1) mit einem
Molekulargewicht von ca. 2000 Da werden in 35 ml Aqua
bidest. gelöst. Die Lösung wird durch einblasen von
10 Stickstoff entgast. Das Reaktionsgemisch wird erwärmt und

unter guter Durchmischung mit konzentrierter Ammoniumhydroxid-Lösung (32 %) versetzt, bis ein pH-Wert von 10 erreicht ist. In einem Reagenzglas werden 6,85 ml 1 molare Eisen-III-Lösung vorgelegt, mit der äquimolaren Menge NTA versetzt und mit Stickstoff entgast. Zur Eisen-III-Lösung werden 667 mg Eisen-II-chlorid-tetrahydrat gegeben und im Stickstoffstrom gelöst. Die Eisenlösung wird innerhalb von 20 Sekunden zur alkalischen Polymer-Lösung gegeben. Anschließend wird die Reaktionslösung mit ca. 6 N Salzsäure neutralisiert und etwa 1 Stunde unter Rückflußbedingungen erhitzt. Nach dem Abkühlen wird für 30 min bei 2500 g zentrifugiert und das Filtrat am Rotationsverdampfer auf etwa 6 ml eingeeengt, der pH-Wert kontrolliert und nach der Konzentrationsbestimmung mit Aqua bidest. auf eine etwa 1 molare Eisenkonzentration eingestellt sowie anschließend 0,22 µm filtriert. Die Lösung kann im Autoklaven sterilisiert werden

Tab. 7: analytische Daten:

	Dimension	Ergebnis	Bemerkung
Gehaltsangaben			
Ausbeute (Eisen)	%	69	
Gehalt (Eisen)	Mol/l	1	ICP-Atomemissionsspektroskopie
Eisen-II/ Gesamteisen	%	7,1	Phenanthrolin-Methode
Polymer (P-Dextran)	mg/ml	421	Anthron-Methode
Polymer/Eisen:	(g/g)	8:1	
Größenangaben			
Kerndurchmesser	nm ± SD	5,5 ± 2,3	Elektronenmikroskop (TEM)

Gesamtdurchmesser	nm \pm SD nm	24,4 \pm 8,4 ca. 31	Laserlichtstreuung (PCS) Ausschluß- Chromatographie
Relaxivität und Suszeptibilität			
Suszeptibilität	EMU/g	96	Magnetische Waage
T1-Relaxivität	l mmol ⁻¹ s ⁻¹	33	ICP- Atomemissionsspektro- skopie
T2-Relaxivität	l mmol ⁻¹ s ⁻¹	148	ICP- Atomemissionsspektro- skopie
Bluthalbwertszeit (200 mmol/kg KGW, Ratte, n=5)	min	59 54 58	(T1) s. Beispiel B1 (T2) s. Beispiel B1 (Fe) s. Beispiel B1

5 B4 Herstellung aus P-CDx mit Eisen-III und
Reduktionsmittel, Natronlauge

- 5,0 g Poly-Carboxydextran (Beispiel A2) mit einem Molekulargewicht von ca. 12000 Da werden in 17,5 ml Aqua bidest. gelöst. Die Lösung wird durch einblasen von
- 10 Stickstoff entgast. Zur Polymer-Lösung werden 10 ml 1 molare Eisen-III-chlorid-hexahydrat-Lösung gegeben und weiter mit Stickstoff entgast. Die Polymer-Lösung wird auf ca. 75 °C erwärmt und dann werden 113,6 mg
- 15 Hydroxylamin-HCl zugegeben (unter Stickstoffbegasung). Das Reaktionsgemisch wird in der Wärme unter guter Durchmischung innerhalb von 30 Sekunden mit ca. 12 ml 3 N Natronlauge versetzt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit ca. 6 N Salzsäure neutralisiert und etwa 1 Stunde unter Rückflußbedingungen erhitzt. Nach dem

- Abkühlen wird für 30 min bei 2500 g zentrifugiert und das Filtrat am Rotationsverdampfer auf etwa 7 ml eingengt, der pH-Wert kontrolliert und nach der Konzentrationsbestimmung mit Aqua bidest. auf eine etwa 1 molare Eisenkonzentration eingestellt sowie anschließend 0,22 μm filtriert. Die Lösung kann im Autoklaven sterilisiert werden (Verfahren A121).

Tab. 8: analytische Daten:

	Dimension	Ergebnis	Bemerkung
Gehaltsangaben			
Ausbeute (Eisen)	%	84	
Gehalt (Eisen)	Mol/l	1	ICP-Atomemissionsspektroskopie
Eisen-II/ Gesamteisen	%	5,4	Phenanthrolin-Methode
Polymer (P-Dextran)	mg/ml	515	Anthron-Methode
Polymer/Eisen:	(g/g)	9:1	
Größenangaben			
Kerndurchmesser	nm \pm SD	4,5 \pm 1,4	Elektronenmikroskop (TEM)
Gesamtdurchmesser	nm \pm SD nm	21,4 \pm 5,4 ca. 24	Laserlichtstreuung (PCS) Ausschluß-Chromatographie
Relaxivität und Suszeptibilität			
Suszeptibilität	EMU/g	88	Magnetische Waage
T1-Relaxivität	l mmol ⁻¹ s ⁻¹	28	ICP-Atomemissionsspektroskopie

T2-Relaxivität	1 mmol ⁻¹ s ⁻¹	138	ICP- Atomemissionsspektro- skopie
Bluthalbwertszeit (200 mmol/kg KGW, Ratte, n=5)	min	57 55 51	(T1) s. Beispiel B1 (T2) s. Beispiel B1 (Fe) s. Beispiel B1

B5 Herstellung mit einer Mischung aus Dextran 4 und Dextran 15

5,0 g einer 1:1 Mischung von Dextran 4 und Dextran 15 mit
 5 einem Molekulargewicht von ca. 4000 - 6000 Da bzw. 15000
 - 20000 werden in 20 ml Aqua bidest. gelöst. Die farblose
 Polymerlösung wird mit 3 N Natronlauge auf einen pH-Wert
 von ca. 12 eingestellt und für 1 Stunde am Rückfluß
 gekocht und dann mit ca. 6 N HCl neutralisiert. Die
 10 dunkelrot-braune Lösung wird durch einblasen von Stick-
 stoff entgast. In einem Reagenzglas werden 6,7 ml 1
 molare Eisen-III-chlorid-hexahydrat-Lösung vorgelegt und
 mit Stickstoff entgast. Zur Eisen-III-Lösung werden 648
 mg Eisen-II-chlorid-tetrahydrat gegeben und im Stick-
 15 stoffstrom gelöst. Die Polymer-Lösung wird auf ca. 75 °C
 erwärmt und die Eisenlösung zugegeben (unter Stickstoff-
 begasung). Das Reaktionsgemisch wird in der Wärme unter
 guter Durchmischung innerhalb von 30 Sekunden mit ca.
 11,5 ml 3 N Natronlauge versetzt. Anschließend wird die
 20 Reaktionslösung mit ca. 6 N Salzsäure neutralisiert und
 etwa 1 Stunde unter Rückflußbedingungen erhitzt. Nach dem
 abkühlen wird für 30 min bei 2500 g zentrifugiert und das
 Filtrat am Rotationsverdampfer auf etwa 8 ml eingengt,
 der pH-Wert kontrolliert und nach der Konzentrations-
 25 bestimmung mit Aqua bidest. auf eine etwa 1 molare
 Eisenkonzentration eingestellt sowie anschließend 0,22 µm
 filtriert. Die Lösung kann im Autoklaven nach dem
 Verfahren A121 sterilisiert werden.

Tab. 9: analytische Daten:

	Dimension	Ergebnis	Bemerkung
Gehaltsangaben			
Ausbeute (Eisen)	%	91	
Gehalt (Eisen)	Mol/l	1	ICP-Atomemissionsspektroskopie
Eisen-II/Gesamteisen	%	12,8	Phenanthrolin-Methode
Polymer (P-Dextran)	mg/ml	570	Anthron-Methode
Polymer/Eisen:	(g/g)	10:1	
Größenangaben			
Kerndurchmesser	nm \pm SD	4,0 \pm 1,1	Elektronenmikroskop (TEM)
Gesamtdurchmesser	nm \pm SD nm	18,1 \pm 3,4 ca. 21	Laserlichtstreuung (PCS) Ausschluß-Chromatographie
Relaxivität und Suszeptibilität			
Suszeptibilität	EMU/g	68	Magnetische Waage
T1-Relaxivität	l mmol ⁻¹ s ⁻¹	21	ICP-Atomemissionsspektroskopie
T2-Relaxivität	l mmol ⁻¹ s ⁻¹	78	ICP-Atomemissionsspektroskopie
Bluthalbwertszeit (200 mmol/kg KGW, Ratte, n=5)	min	61 59 67	(T1) s. Beispiel B1 (T2) s. Beispiel B1 (Fe) s. Beispiel B1

C: Herstellung der GrundsubstanzenC1 Dialyse gegen Wasser

5 ml der Lösung nach Beispiel B1 werden in einen Visking
5 Dialyseschlauch gefüllt und unter Rühren 5 mal für
jeweils 6 h gegen 1 l frisches Aqua bidest dialysiert.
Das Retentat wird durch Verdünnen mit Aqua bidest auf
eine Eisenkonzentration von 200 mMol/l eingestellt und
anschließend durch sterile 0,22 µm Filter (Cellulose-
10 acetat) in Portionen à 5 ml in sterile 10 ml Vials
abgefüllt. Die desorbierte Lösung kann im Autoklaven
sterilisiert werden.

15 C2 Dialyse gegen 20 mMol Natriumlactat

5 ml der Lösung nach Beispiel B1 werden in einen Visking
Dialyseschlauch gefüllt und unter Rühren 5 mal für
jeweils 6 h gegen 1 l frische Natriumlactat-Lösung (20
mMol/l, pH 7) dialysiert. Anschließend wird noch 2 mal
20 für 5 h gegen jeweils 1 l frisches Aqua bidest. dialy-
siert. Das Retentat wird durch Verdünnen mit Aqua bidest
auf eine Eisenkonzentration von 200 mMol/l eingestellt
und anschließend durch sterile 0,22 µm Filter (Cellulose-
acetat) in Portionen a 5 ml in sterile 10 ml Vials
25 abgefüllt.

C3 Ultrafiltration mit Amicon

Jeweils 5 ml der Lösung nach Beispiel B1 werden in
präparative Ultrafiltrationseinheiten pipettiert und mit
30 Aqua bidest auf 15 ml aufgefüllt (Centriprep 100, Cut off
100 kDa) und für 1 h bei 1000 g ultrafiltriert.
Anschließend wird das Filtrat verworfen und der
Retentatbehälter wieder bis zur 15 ml Marke mit frischem
Aqua bidest. aufgefüllt und erneut ultrafiltriert. Das

Retentat wird durch Verdünnen mit Aqua bidest auf eine Eisenkonzentration von 200 mMol/l eingestellt und anschließend durch sterile 0,22 µm Filter (Celluloseacetat) in Portionen a 5 ml in sterile 10 ml Vials
5 abgefüllt.

C4 Chromatographische Trennung

5 ml der Lösung nach Beispiel B1 werden mit einem 10 ml Superloop auf eine S400HR Sephacryl-Säule (100 x 5 cm)
10 gegeben und mit 50 mM Zitronensäure/250 mM Mannit mit einem Flow von 300 ml/Stunde eluiert. Die Fraktion von 450 ml bis 840 ml wird gesammelt und im Rotationsverdampfer bei 60 °C im Vakuum auf ca. 50 ml aufkonzentriert. Das Konzentrat wird 3 mal für 6 Stunden gegen
15 bidest. Wasser dialysiert, erneut am Rotationsverdampfer aufkonzentriert und nach der Eisenbestimmung auf eine Konzentration von 200 mMol Eisen/l eingestellt. Die Lösung wird durch 0,22 µm Celluloseacetat Filter
20 filtriert und in Portionen a 5 ml in sterilisierte 10 ml Vials abgefüllt. Die Lösungen können im Autoklaven sterilisiert werden.

Tab. 10: analytische Daten zu den Grundbausteinen nach Beispiel C1-C4

Beispiel	Ausbeute (Fe)	Polymer : Eisen [= 200 mMol/l] (g/g)
C1	96 %	0,501 ± 0,025
C2	94 %	0,300 ± 0,020
C3	89 %	0,610 ± 0,041
C4	67 %	0,143 ± 0,030

25 Die physiko-chemischen Daten zu den magnetischen Eigenschaften und zu den Größenparametern entsprechen den Werten der Ausgangsverbindung (Beispiel B1).

D: ApplikationslösungenD1 Dextran T10

5,0 ml Lösung nach Beispiel C1 mit einer Konzentration von 200 mMol Fe/l (entsprechend 56 mg Gesamteisen) werden in ein 10 ml Vial vorgelegt. 33,6 mg Dextran T10 als Targetpolymer werden in 6,0 ml Aqua bidest gelöst und über eine Spritze mit Filtervorsatz (0,22 µm) unter aseptischen Bedingungen 5,0 ml zu der Eisenoxid-Lösung gegeben. Der Gewichtsquotient Polymer zu Eisen ist 1 (Rest Synthesepolymer = 28 mg + Targetpolymer = 28 mg). Die Zubereitung enthält jetzt 10 ml 100 mmolare (Eisen) Lösung, die direkt zur Anwendung für die intravenöse MR-Lymphographie geeignet ist.

15

D2 Dextran FP1 Herstellung aus 2 Lösungen

5,0 ml Lösung nach Beispiel C1 mit einer Konzentration von 200 mMol Fe/l (entsprechend 56 mg Gesamteisen) werden in ein 10 ml Vial vorgelegt. 302,4 mg Dextran FP1 als Targetpolymer werden in 6,0 ml Aqua bidest gelöst und 5,0 ml über eine Spritze mit Filtervorsatz (0,22 µm) unter aseptischen Bedingungen zu der Eisenoxid-Lösung gegeben. Der Gewichtsquotient Polymer zu Eisen ist 5 (Rest Synthesepolymer = 28 mg + Targetpolymer = 252 mg). Die Zubereitung enthält jetzt 10 ml 100 mmolare (Eisen) Lösung, die direkt zur Anwendung für die intravenöse MR-Lymphographie geeignet ist.

25

D3 Dextran FP1 als Lyophilisat

30 5,0 ml Lösung nach Beispiel C1 mit einer Konzentration von 200 mMol Fe/l (entsprechend 56 mg Gesamteisen) werden in ein 10 ml Vial vorgelegt. 302,4 mg Dextran FP1 als

Targetpolymer werden in 6,0 ml Aqua bidest gelöst und 5,0 ml über eine Spritze mit Filtervorsatz (0,22 µm) unter aseptischen Bedingungen zu der Eisenoxid-Lösung gegeben. Der Gewichtsquotient Polymer zu Eisen ist 5
5 (Rest Synthesepolymer = 28 mg + Targetpolymer = 252 mg). Die Lösung wird in der Injektionsflasche lyophilisiert und dann verschlossen.

10 Die Zubereitung der Applikationslösung erfolgt durch Zugabe von 10 ml physiologischer Kochsalzlösung; die Flasche enthält jetzt 10 ml 100 mmolare (Eisen) Lösung, die zur Anwendung für die intravenöse MR-Lymphographie geeignet ist.

15 D4 Dextran FP1

252 mg Dextran FP1 als Targetpolymer werden in eine 5 ml Injektionsflasche eingewogen und mit 5,0 ml Lösung nach Beispiel C1 mit einer Konzentration von 200 mMol Fe/l (entsprechend 56 mg Gesamteisen) aufgefüllt und die
20 Flasche dann verschlossen. Durch Drehen der Injektionsflasche wird das Dextran FP1 gelöst. Der Gewichtsquotient Polymer zu Eisen ist 5 (Rest Synthesepolymer = 28 mg + Targetpolymer = 252 mg).
Die Zubereitung enthält jetzt 5 ml 200 mmolare (Eisen)
25 Lösung, die direkt zur Anwendung für die intravenöse MR-Lymphographie geeignet ist.

D5 Laminarin

5,0 ml Lösung nach Beispiel C1 mit einer Konzentration
30 von 200 mMol Fe/l (entsprechend 56 mg Gesamteisen) werden in ein 10 ml Vial vorgelegt. 33,6 mg Laminarin als Targetpolymer werden in 6,0 ml Aqua bidest gelöst und 5,0 ml über eine Spritze mit Filtervorsatz (0,22 µm)

unter aseptischen Bedingungen zu der Eisenoxid-Lösung gegeben. Der Gewichtsquotient Polymer zu Eisen ist 1 (Rest Synthesepolymer = 28 mg + Targetpolymer = 28 mg). Die Zubereitung enthält jetzt 10 ml 100 mmolare (Eisen) Lösung, die direkt zur Anwendung für die intravenöse MR-Lymphographie geeignet ist.

D6 mit Transferrin

5,0 ml Lösung nach Beispiel C1 mit einer Konzentration von 200 mMol Fe/l (entsprechend 56 mg Gesamteisen) werden in ein 10 ml Vial vorgelegt. 33,6 mg humanes Fe₂-Transferrin als Targetpolymer werden in 6,0 ml Aqua bidest gelöst und 5,0 ml über eine Spritze mit Filtervorsatz (0,22 µm) unter aseptischen Bedingungen zu der Eisenoxid-Lösung gegeben. Der Gewichtsquotient Polymer zu Eisen ist 1 (Rest Synthesepolymer = 28 mg + Targetpolymer = 28 mg). Die Zubereitung enthält jetzt 10 ml 100 mmolare (Eisen) Lösung, die zur Anwendung als spezifisches Kontrastmittel für die Darstellung proliferierender Zellen (Tumore) geeignet ist.

D7 Mit Endothelin-Agonist

5,0 ml Lösung nach Beispiel C1 mit einer Konzentration von 200 mMol Fe/l (entsprechend 56 mg Gesamteisen) werden in ein 10 ml Vial vorgelegt. 33,6 mg eines Endothelin-Rezeptor spezifischen Heptapeptids [Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp] als Targetpolymer werden in 6,0 ml Aqua bidest gelöst und 5,0 ml über eine Spritze mit Filtervorsatz (0,22 µm) unter aseptischen Bedingungen zu der Eisenoxid-Lösung gegeben. Der Gewichtsquotient Polymer zu Eisen ist 1 (Rest Synthesepolymer = 28 mg + Targetpolymer = 28 mg).

Die Zubereitung enthält jetzt 10 ml 100 mmolare (Eisen) Lösung, die zur Anwendung für das intravenöse MR-Plaques-Imaging (Atherosklerose-Imaging) geeignet ist.

5 E: Anwendungen

Anwendungsbeispiel E1

• MR-Lymphographie an der Ratte

10 Ziel: Vergleich der relativen Signalintensität in verschiedenen Lymphknoten/Lymphknotengruppen zwischen der Ausgangsverbindung (Synthesepolymer = Targetpolymer) und einer nach dem Desorptions-Adsorptions-Verfahren hergestellten Modifikation (Synthesepolymer \neq Targetpolymer) am Tiermodell Ratte.

15

Substanz: Spezifische Nanopartikel (Beispiel D5);
Vergleich = Grundbaustein nach Beispiel C1

(= D5 ohne Targetpolymer)

20

Tiere: Ratte, SPF -Han Wistar; ca. 150 g

Dosierung: 100 μ Mol Fe/kg Körpergewicht (KGW)

Zeiten: 24 h p. i. (post injectionem)

MR-Methode:

Gerät: Siemens Magnetom 1,5 T

25

MR Ganzkörpertomograph mit
Extremitätenspule

MR-Parameter: Field of View (FOV) = 150 mm, Matrix =
256x256; Slice = 3 mm

Schichtorientierung = frontal

30

Sequenz 1: Protonendichte-betonte Spin-Echo Sequenz

(SE) mit TR = 2000 ms und TE = 15 ms

Sequenz 2: T2-gewichtete Gradienten-Echo-Sequenz

(GE) mit TR = 135 ms und TE = 15 ms; FA = 15°

Ex-vivo-Modell:

- Lymphknoten-anreicherung an Ratten und Kaninchen
- 5 Zur Untersuchung der Anreicherung und Verteilung der Substanzen in verschiedenen Lymphknoten/Lymphknotengruppen wurde ein Ex-vivo-Agar-Phantom verwendet. Dieses Ex-vivo-Modell hat den Vorteil auch bei kleinen Versuchstieren (Maus, Ratte, Kaninchen)
- 10 die Akkumulation in verschiedenen zentralen und peripheren Lymphknoten(gruppen) bewerten zu können und ermöglicht damit auch Aussagen zur Homogenität der Verteilung; eine Quantifizierung der Signalbeeinflussung ist möglich.
- 15 Den Versuchstieren (Maus, Ratte oder Kaninchen) wird die Lösung der Nanopartikel über die Schwanzvene injiziert (Bolus). Nach 24 Stunden werden die Tiere getötet und verschiedene Lymphknoten bzw. Lymphknotengruppen präpariert (Lnn. popliteales, Lnn. mandibulares, Lnn.
- 20 iliacales, Lnn. axillares, Lnn. mandibulares, Lnn. inguinales). Die Lymphknoten werden anschließend in ein Agar-Phantom eingegossen und bis zur MR-Messung im Kühlschrank verwahrt (max. 24 Stunden).
-
- 25 • Herstellung des Ex-vivo Agarose-Phantoms
- Zur Herstellung des Phantoms werden 10 g Agar-Agar für die Mikrobiologie in 500 ml bidestilliertem Wasser, dem 0,5 ml Magnevist (0,5 Mol/l Gadolinium-DTPA-dimeglumin) für einen Signal-homogenen Hintergrund in der MR-Aufnahme
- 30 zugesetzt sind, suspendiert. Die Suspension wird aufgekocht und dann auf ca. 80 °C abgekühlt und bei dieser Temperatur gehalten. Etwa die Hälfte der Agar-Lösung wird zu einer 0,5 - 1 cm dicken Schicht in eine Plastikschiene gegossen. Nach dem Erkalten werden die
- 35 Organproben auf der Agarschicht angeordnet (entsprechend

linker-rechter Körperhälfte bzw. in "physiologischer Reihenfolge" von oben nach unten) und mit wenig Agar-Lösung fixiert (Pasteurpipette). Abschließend wird eine zweite Schicht Agar-Lösung über die Gewebeproben gegossen. Das Phantom wird innerhalb von 24 Stunden gemessen und bis zur Untersuchung im Kühlschrank gelagert.

Zur Kontrolle (Organleerwerte) werden Tiere ohne Injektion von Nanopartikeln mitgeführt und die Gewebe identisch präpariert bzw. ein entsprechendes Phantom angefertigt.

Neben der visuellen Auswertung erfolgt zum einen eine Quantifizierung der relativen Signalreduktion in den einzelnen Geweben über

und zum anderen werden die Gewebeproben nach der MR-Messung wieder vorsichtig aus dem Agar-Phantom herausgelöst, in konzentrierter Salpetersäure zersetzt und dann mit ICP-AES (inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy) der Eisengehalt quantifiziert. An adäquat behandelten Kontrolltieren ohne Applikation von Nanopartikeln wurden die Leerwerte ermittelt und bei der Eisen-Bestimmung der Proben berücksichtigt.

Ergebnis:

- Abb. 5: MR-Aufnahmen von in Agarose eingebetteten Ratten-
lymphknoten; Resektion 24 h nach Applikation von der
Vergleichssubstanz (Beispiel C2, links) bzw. der
modifizierten Substanz nach Beispiel D2 (rechts);
5 Dosis jeweils 100 μmol Fe/kg.
- Abb. 6: Modifizierte Charge vs Originalsubstanz: Quantitative
Auswertung (aus Abb. 5) der relativen Signalinten-
sitäten für SE 2000/15 in verschiedenen Lymphknoten der
Ratte 24 h nach Magnetit-Applikation (100 μmol
10 Fe/kg).
- Abb. 7: Modifizierte Charge vs Originalsubstanz: Quantitative
Auswertung (aus Abb. 5) der relativen Signalinten-
sitäten GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten
der Ratte 24 h nach Magnetit-Applikation (100 μmol
15 Fe/kg).

Die Auswertung über die Beeinflussung der relativen
lymphonodalen Signalintensität (Abb. 6 = SE; Abb. 7 = GE)
der spezifischen Nanopartikel bzw. der Ausgangssubstanz
20 demonstriert eindrucksvoll die homogenere Anreicherung
der modifizierten Substanz in den Lymphknoten. Die
lymphonodale Signalreduktion von mandibularen, axillären,
iliakalen, poplitealen Lymphknoten sowie der mittleren
Anreicherung über alle Lymphknoten-Gruppen durch die mit
25 Dextran FP1 als Sekundärcoat modifizierte Charge unter-
scheidet sich signifikant (t-Test, $p < 0,05$) von der
unmodifizierten Ausgangsverbindung (Abb. 6 und 7).
Die Überlegenheit der spezifischen Nanopartikel wird
schon durch die optische Beurteilung der "Schwärzung" der
30 einzelnen Lymphknoten in der Abbildung 5 eindrucksvoll
gezeigt. Besonders bemerkenswert ist die Homogenität der
Verteilung über alle untersuchten Lymphknoten.

Anwendungsbeispiel E2

- MR-Lymphographie am Kaninchen

Ziel: Vergleich der relativen Signalintensität in verschiedenen Lymphknoten/Lymphknotengruppen zwischen der Ausgangsverbindung (Synthesepolymer = Targetpolymer) und einer nach dem Desorptions-Adsorptions-Verfahren hergestellten Modifikation (Synthesepolymer \neq Targetpolymer) am Tiermodell Kaninchen.

Substanz: Spezifische Nanopartikel (Beispiel D2);
Vergleich = Grundbaustein nach Beispiel C2

(= D2 ohne Targetpolymer)

Tiere: Neuseeländer, ca. 3 kg

Dosierung: 150 μ Mol Fe/kg Körpergewicht (KGW)

Zeiten: 24 h p. i. (post injectionem)

MR-Methode: MR-Tomographie in SE und GE-Technik
(s. Anwendungsbeispiel E1)

In-vivo-Modell: Kaninchen mit stimulierten Lymphknoten

- Lymphknotenstimulation mit Eigelb

Die Kaninchen wurden etwa eine Woche vor der Applikation der Prüfsubstanzen vorbehandelt. Zur Induktion einer reaktiven Hyperplasie (Lymphknotenvergrößerung) wurde den Versuchstieren 3 x im Abstand von 2 Tagen je 0,5 ml einer sterilen Eigelbsuspension (Oxoid) i.m. in den Oberschenkel und s.c. in die Flanke injiziert.

Ex-vivo-Modell: Agarose-Phantom
(s. Anwendungsbeispiel E1)

Ergebnis:

Abb. 8: Frontale prae- und post-Kontrast MR-Aufnahmen der Beckenregion des Kaninchens in der Protonen-Dichtegewichteten Spin-Echo-Sequenz (SE 2000/15). (links:

prae-Kontrast; rechts: spezifische Substanz D2 (150 $\mu\text{mol Fe/kg}$)).

5 Abb. 9: Frontale prae- und post-Kontrast MR-Aufnahmen der Beckenregion des Kaninchens in der Protonen-Dichte gewichteten Spin-Echo-Sequenz (SE 2000/15). (links: prae-Kontrast; rechts: Ausgangsverbindung C2 (150 $\mu\text{mol Fe/kg}$)).

10 Abb. 10: Spezifische Nanopartikel vs unspezifische Ausgangspartikel: Relative Signalintensitäten für SE 2000/15 in verschiedenen Lymphknoten des Kaninchens 24 h p.i. (150 $\mu\text{mol Fe/kg}$, n=3). (Quantitative Auswertung nach Abb. 8 und 9).

15 Abb. 11: Frontale prae- und post-Kontrast MR-Aufnahmen der Beckenregion des Kaninchens in der T2*-gewichteten Gradienten-Echo-Sequenz (GE 135/15/15°). (links: prae-Kontrast; rechts: spezifische Substanz D2 (150 $\mu\text{mol Fe/kg}$)).

20 Abb. 12: Frontale prae- und post-Kontrast MR-Aufnahmen der Beckenregion des Kaninchens in der T2*-gewichteten Gradienten-Echo-Sequenz (GE 135/15/15°). (links: prae-Kontrast; rechts: Ausgangsverbindung C2 (150 $\mu\text{mol Fe/kg}$)).

25 Abb. 13: Spezifische Nanopartikel vs unspezifische Ausgangspartikel: Relative Signalintensitäten für GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten des Kaninchens 24 h p.i. (150 $\mu\text{mol Fe/kg}$, n=3). (Quantitative Auswertung der Abb. 11 und 12)

30 Abb. 14: Ex vivo MR-Aufnahmen (GE-Sequenz) von Agarose-eingebetteten Lymphknoten des Kaninchens; Dosis - 150 $\mu\text{mol Fe/kg}$; links: unspezifische Vergleichspartikel; rechts: spezifische Nanopartikel.

35 Abb. 15: Spezifische Nanopartikel vs unspezifische Ausgangspartikel: Relative Signalintensitäten für GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten des Kaninchens 24 h p.i. (150 $\mu\text{mol Fe/kg}$, n=3).

Die Auswertung der Beeinflussung der relativen lymphonodalen Signalintensität (Abb. 8, 9 = SE; Abb. 11, 12 = GE) durch die spezifischen Nanopartikel bzw. die Ausgangspartikel demonstriert die homogenere Signalreduktion der Lymphknoten durch die modifizierte Substanz. Die lymphonodale Signalreduktion (GE-Sequenz) in den von subiliacalen, iliakalen und poplitealen Lymphknoten sowie die mittlere Anreicherung über alle Lymphknoten-Gruppen durch die FP1-modifizierten Nanopartikel unterscheidet sich signifikant (gepaarter t-Test, $p < 0,05$) von den unmodifizierten Vergleichspartikeln (Abb. 13). Die homogenere interlymphonodale Signalbeeinflussung (Abb. 15) der spezifischen Partikel ist auch deutlich in den MR-tomographischen Aufnahmen der Agarose-eingebetteten Lymphknoten zu erkennen (Abb. 14); hier zeigt die Vergleichssubstanz, wie auch bei der Ratte beobachtet, eine starke, aber auf die mesenterialen Lymphknoten beschränkte Signalreduktion.

Anwendungsbeispiel E3

- Dosisabhängigkeit der Lymphknoten-anreicherung an der Ratte

Vergleich der relativen Signalintensität in verschiedenen Lymphknoten/Lymphknotengruppen zwischen der Ausgangsverbindung (Synthesepolymer = Targetpolymer) und einer nach dem Desorptions-Adsorptions-Verfahren hergestellten Modifikation (Synthesepolymer \neq Targetpolymer) in Abhängigkeit der applizierten Dosis.

Substanz: Spezifische Nanopartikel (Beispiel D2);
Vergleich = Grundbaustein nach Beispiel C2 (= D2 ohne Targetpolymer)

Tiere: s. Anwendungsbeispiel E1

Dosierung: 50 -200 μ Mol Fe/kg Körpergewicht (KGW)
(n=3 /Dosis)
Zeiten: 24 h p. i. (post injectionem)
Methode: MR-Tomographie in SE und GE-Technik
5 (s. Anwendungsbeispiel E1)
Ex-vivo-Modell: Agarose-Phantom
(s. Anwendungsbeispiel E1)

Ergebnis:

- 10 Abb. 16: Spezifische Nanopartikel nach Beispiel D2 vs
unspezifische Partikel nach Beispiel C2: Relative
Signalintensitäten in Abhängigkeit der applizierten
Dosis für SE 2000/15 in verschiedenen Lymphknoten der
Ratte 24 h nach Applikation der Partikel.
- 15 Abb. 17: Spezifische Nanopartikel nach Beispiel D2 vs
unspezifische Partikel nach Beispiel C2: Relative
Signalintensitäten in Abhängigkeit der applizierten
Dosis für GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten
der Ratte 24 h nach Applikation der Partikel.

20

In allen Lymphknotengruppen mit Ausnahme der mesen-
terialen und inguinalen Lymphknoten zeigt sich eine
signifikant ($p < 0,05$) bessere Signalreduktion durch die
nach Beispiel D2 modifizierte Ausgangsverbindung schon
25 bei halb so hoher Dosierung (200 μ mol Fe/kg (C2) vs 100
 μ mol Fe/kg (D2)). Diese deutlichen Unterschiede zeigen
sich auch, wenn man die mittlere Signalbeeinflussung über
alle Lymphknotenstationen betrachtet (s. Tab 11).

30 Tab. 11: Mittlere relative Signalintensitäten und
Standardabweichung über alle Lymphknotenstationen
in Abhängigkeit der applizierten Substanz und
Dosis.

Probe	Dosis	mittlere rel. Signalintensität
-------	-------	-----------------------------------

C2	100 $\mu\text{mol Fe/kg}$	$0,85 \pm 0,13$
D2	100 $\mu\text{mol Fe/kg}$	$0,45 \pm 0,23$
C2	200 $\mu\text{mol Fe/kg}$	$0,49 \pm 0,17$
D2	200 $\mu\text{mol Fe/kg}$	$0,35 \pm 0,15$

Anwendungsbeispiel E4

- Zeitabhängigkeit der Lymphknoten-anreicherung

- 5 Ziel: Vergleich der relativen Signalintensität in verschiedenen Lymphknoten/Lymphknotengruppen zwischen der Ausgangsverbindung (Synthesepolymer = Targetpolymer) und einer nach dem Desorptions-Adsorptions-Verfahren hergestellten Modifikation (Synthesepolymer \neq Targetpolymer) in Abhängigkeit der Zeit nach Applikation.
- 10 Substanz: Spezifische Nanopartikel (Beispiel D2);
Vergleich = Grundbaustein nach Beispiel C2 (= D2 ohne Targetpolymer)
- Tiere: Ratte; (s. Anwendungsbeispiel E1)
- 15 Dosierung: 200 $\mu\text{Mol Fe/kg}$ Körpergewicht (KGW) (n=3 /Zeitpunkt)
- Zeiten: 4 - 168 h p. i. (post injectionem)
- Methode: MR-Tomographie in SE und GE-Technik
(s. Anwendungsbeispiel E1)
- 20 Ex-vivo-Modell: Agarose-Phantom
(s. Anwendungsbeispiel E1)

Ergebnis:

- 25 Abb. 18: Vergleichssubstanz nach Beispiel C2: Relative Signalintensitäten für SE 2000/15 in verschiedenen Lymphknoten der Ratte in Abhängigkeit der Zeit nach Applikation.

Abb. 19: Spezifische Nanopartikel nach Beispiel D2: Relative Signalintensitäten für SE 2000/15 in verschiedenen Lymphknoten der Ratte in Abhängigkeit der Zeit nach Applikation.

5 Abb. 20: Vergleichssubstanz nach Beispiel C2: Relative Signalintensitäten für GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten der Ratte in Abhängigkeit der Zeit nach Applikation.

10 Abb. 21: Spezifische Nanopartikel nach Beispiel D2: Relative Signalintensitäten für GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten der Ratte in Abhängigkeit der Zeit nach Applikation.

15 Die zeitabhängigen MR-tomographischen Untersuchungen zur lymphonodalen Signalreduktion nach intravenöser Applikation der Substanzen zeigen deutlich, daß auch zeitabhängig die nicht-spezifische Ausgangssubstanz eine schlechtere Signalreduktion in den Lymphknoten verursacht als die spezifische Modifikation nach Beispiel D2.

20

Anwendungsbeispiel E5

- Kombination mit physiotherapeutischen Maßnahmen am Beispiel Temperatur

25 Ziel: Vergleich der relativen Signalintensität in verschiedenen Lymphknoten/Lymphknotengruppen in Abhängigkeit von der durch ein Wärmebad regulierten peripheren Körpertemperatur.

30 Substanz: Spezifische Nanopartikel (Beispiel D2);
Dosierung: 100 µMol Fe/kg Körpergewicht (KGW) (n=7 /Gruppe)
Zeiten: 24 h p. i. (post injectionem)
Methode: MR-Tomographie in GE-Technik
35 (s. Anwendungsbeispiel E1)

Hyperthermie-Modell:

• Applikation von Wärme

Um den Einfluß von Wärme auf die Anreicherung des Kontrastmittels in verschiedenen Lymphknotengruppen zu untersuchen, wurden Ratten für 3 - 4 h in Narkose gelegt, um sie dann für 2 h in ein Wasserbad zu legen. In diesem Wasserbad lagen die Ratten mit der linken Körperseite auf einer Wärmeplatte und mit der rechten Körperseite auf einer gleich hohen isolierenden Kunststoffplatte, die nicht erwärmt wurde. Dadurch entstand eine Temperaturdifferenz zwischen der Wassertemperatur auf der linken Körperseite und der Wassertemperatur auf der rechten Körperseite. Die Wassertemperatur unter der linken Schulter der Ratten betrug anfangs 41,0 - 41,5 °C und nach 30 min pendelte sich die Temperatur auf den konstanten Wert von 41,5 - 42,0 °C ein. Unter der rechten Schulter betrug die Wassertemperatur anfangs 37,0 - 37,5 °C und nach 30 min. wurde die dann konstant bleibende Temperatur von 37,5 - 38,0 °C erreicht. Nachdem die Ratten 30 min. im Wasserbad lagen, bekamen sie die Nanopartikel in einer Dosis von 100 µmol Fe/kg KGW intravenös als Bolus injiziert. Nach weiteren 1,5 h im Wasserbad bei konstanten Temperaturen wurden die Ratten wieder in den Käfig zurückgelegt und 24 h post injektionem die Lymphknoten präpariert und MR-tomographisch untersucht.

Ergebnis:

Abb. 22: Beeinflussung der Lymphknoten-anreicherung durch gezielte Applikation von Wärme. In der linken prä-Kontrast Aufnahme sind die poplitealen Lymphknoten nur als helle Flecken zu erahnen. In der rechten Abbildung ist der Einfluß der Wärmebehandlung eindrucksvoll demonstriert. Die linke Seite der narkotisierten Ratte lag auf einer isolierenden Kunststoffplatte und hatte die normale Körper-

temperatur während die rechte Seite in einem Wasserbad auf 41,5 - 42,0 °C erwärmt wurde. Die "kalte" Seite zeigt praktisch keine Anreicherung während die erwärmte Seite eine hohe und homogene intralymphonodale Akkumulation der Nanopartikel aufweist. (Nanopartikel nach Beispiel D 2; 100 µMol/kg KGW; 24 h p. i.; GE 135/15/15)

Die In-vivo-Aufnahme (Abb. 22) demonstriert eindrucksvoll die Effekte der Wärmebehandlung. Während die kalte, nicht erwärmte, linke Seite der Ratte keine erkennbare Anreicherung in den poplitealen Lymphknoten zeigt, hat die erwärmte rechte Seite eine hohe und homogene Signalauslöschung (Anreicherung) in den beobachteten Lnn. popliteales.

Um die Effekte der Erwärmung besonders deutlich zeigen zu können, wurden die Ratten narkotisiert in das Wärmebad gelegt. Die Narkose führt zu einem Stillstand der peripheren Muskelaktivität, einem verminderten Lymphfluß und herabgesetzter Gefäßpermeabilität mit der Folge, daß sich ohne Erwärmung praktisch keine Anreicherung der Nanopartikel nachweisen läßt.

Anwendungsbeispiel E6

- MR-Angiographie

Substanz:	Spezifische Nanopartikel (Beispiel D2)
Tiere:	Ratte (s. Anwendungsbeispiel E1)
Dosis:	20 µmol Fe / kg i. v.
Zeitpunkt:	0-2 h p. i..
MR-Technik:	
Gerät:	Siemens Magnetom 1,5 T

MR Ganzkörper-tomograph mit
Extremitäten-spule

MR-Parameter:

Siemens Magnetom 1.5 T, Extremitäten-
spule, Dynamik (transversal) mit T1-
gewichteter SE Sequenz (TR: 200 ms,
TE: 10 ms), FOV 170 mm,
Matrix 256x256, SD: 3 mm;
- koronare MIPS von 3D-Flash (TR: 40
(60) ms, TE: 6 ms, FA 60 (40) °) und
3D-FISP-Sequenz (TR: 40 ms, TE: 7 ms,
FA 35 °), FOV 240 mm, Matrix 256x256,
SD: 17 mm.

MR-Auswertung:

Signalintensitäten in benutzerdefi-
nierten Regions of Interest von
Gefäßen (V. cava), Leber, Fett und
Muskel. Die Signalintensitäten werden
standardisiert auf den Hintergrund
kalkuliert.

Ergebnisse:

Abb. 23 : Transversale Dynamik-Studie des Rattenabdomens mit
einer T1-gewichteten SE Sequenz (TR: 200 ms, TE: 10
ms) nach Bolus-Injektion der spezifischen
Nanopartikel nach Beispiel D2 (Dosis 20 µmol Fe/kg);
deutliches Signal-Enhancement (1 min p.i.) in den
intrahepatischen Gefäßen und der V. cava).

Abb. 24: Vergleich der relativen Signalintensitäten für SE
TR/TE 200ms/10ms im venösen Gefäß und dem Leber-
parenchym für die spezifischen Nanopartikel nach
Beispiel D2 und die unspezifische Vergleichssubstanz
nach Beispiel C2; Dosis 20 µmol Fe/kg;.

Abb. 25: Koronare MIPS (maximum-intensity projections) von 3D-
Flash-Aufnahmen (TR: 40 ms, TE: 6 ms, FA 60 °);
Vergleich der spezifischen Nanopartikel nach Beispiel
D2 (links) mit der Vergleichssubstanz C2 (rechts) -
Dosis jeweils 20 µmol Fe/kg.

Die Abbildungen 23 und 25 zeigen deutlich die Vorteile der spezifischeren Nanopartikel (nach Beispiel D2) gegenüber der Ausgangssubstanz nach Beispiel C2. Die graphische Zusammenfassung des zeitlichen Signalverlaufs (Abb. 24) in der Vena cava bzw. im Leberparenchym demonstriert die überragenden Eigenschaften der spezifischen Nanopartikel für die Anwendung als Kontrastmittel in der MR-Angiographie. Das Enhancement ist dreifach höher als bei der Kontrollsubstanz und der hellmachende Effekt hält lange an und ist sehr konstant (diagnostisches Fenster > 60 min).

15 Anwendungsbeispiel E7

- Visuelle Darstellung von Lymphknoten an der gesunden Ratte und am tumortragenden Kaninchen

20 Ziel: Nachweis der Eignung der erfindungsgemäßen Nanopartikel für die Verwendung als visuelle Marker-substanz in der chirurgischen Medizin.

Substanz: Spezifische Nanopartikel (Beispiel D2)

25 Tiere: Ratte, SPF Han-Wistar; ca. 150 g
Russenkaninchen (Chbb: HM, Thomae GmbH) mit implantiertem VX2-Tumor (Tumorbank des Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg); ca. 2,6 kg. Der Tumor wurde durch Injektion von $3 \cdot 10^6$ lebenden Tumorzellen in die kaudolaterale Oberschenkelmuskulatur implantiert. Die Aufnahme erfolgt 20 Tage nach der Implantation.

35 Dosierung: Ratte: intravenöse Injektion von 500 μ Mol Fe/kg Körpergewicht

Kaninchen: Interstitielle Applikation von
20 μ Mol pro Pfote
Zeiten: Ratte: 1, 4 und 24 h p. i.
Kaninchen: 12 h p. i.

5

Ergebnisse

- 10 Abb. 26: Erfindungsgemäße Nanopartikel als "intraoperative"
Markersubstanzen für die visuelle Detektion von
Lymphknoten (Übersichtsaufnahme)
- Abb. 27: Erfindungsgemäße Nanopartikel als "intraoperative"
Markersubstanzen für die visuelle Detektion von
Lymphknoten (Detailansicht).
- 15 Abb. 28: Demonstration von Metastasen in Lymphknoten durch
visuelle Detektion in metastatischen Lymphknoten am
Kaninchen. Die Metastasen sind als helle Aussparungen
im ansonsten homogen dunkel gefärbten Lymphknoten
erkennbar.
- 20 Die Aufnahmen der Ratten (Abb. 26 und 27) zeigen, daß
eine Vielzahl unterschiedlichster Lymphknoten-
/Lymphknotengruppen durch die einmalige intravenöse
Applikation der Lösung der Nanopartikel angefärbt werden
kann. Die Lymphknoten heben sich deutlich vom umgebenden
25 Gewebe ab und können so einfach detektiert werden um dann
ggf. vom Operateur entfernt zu werden.
- Die Untersuchungen am VX2-tumortragenden Kaninchen
demonstrieren, daß durch die Anwendung der spezifischen
Nanopartikel auch nach interstitieller Applikation die
30 Lymphknoten im Einzugsgebiet homogen angefärbt sind und
daß auch kleine Metastasen schon rein visuell als helle

Aussparungen im dunkel angefärbten gesunden Lymphknotengewebe abgrenzbar sind (Abb. 28).

Anwendungsbeispiel E8

- 5 • Zellexperiment zum Nachweis der Spezifität der Nanopartikel

Ziel: Nachweis der spezifischen zellulären Aufnahme (Rezeptor-vermittelte Endozytose) bei Nanopartikeln mit Transferrin als Sekundärcoat (Targetpolymer)

10 Substanz: Spezifische Nanopartikel (Beispiel D6)

Vergleich: Grundsubstanz nach Beispiel C1 (D6 ohne Transferrin)

Konzentration: 0,5 mMol Fe/l Medium

15 Zeiten: 18 h Inkubation bei 37 °C; 5 % CO₂ - 95 % Luft

Zellkultur:

- Zellaufnahme in humane Myeloma-Zellen

Humane Myeloma-Zellen (ATCC CRL 9068; Zelllinie NCI H929) werden in einer Konzentration von mindestens $1 \cdot 10^6$

20 Zellen/ml in RPMI 1640 mit 10 % FCS und 0,05 mMol/l 2-Mercaptoethanol in Kultur genommen (37 °C, 5 % Kohlendioxid; Kulturflaschen 225 cm²).

Wenn die Zellen eine Konzentration von ca. $1,5 \cdot 10^6$

25 Zellen/ml erreicht haben, werden die Zellen zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert.

Die Zellen werden mit den Nanopartikeln in einer Konzentration von 0,5 mMol/l (berechnet als Eisen) für 18 Stunden inkubiert.

30 Die Zellen werden pelletiert, 2 mal mit PBS gewaschen und dann in einem Aliquot die Zellzahl bestimmt (Neubauer-Zählkammer). Das Zellpellet wird in 500 µl konz. Salpetersäure/ 100 µl Wasserstoffperoxid durch Erhitzen aufgelöst und auf ein Volumen von 5,0 ml aufgefüllt.

Anschließend wird mit Atomemissionsspektroskopie (AES, Nachweisgrenze 0,1 ppm) die Eisenkonzentration bestimmt.

5

Ergebnisse

Abb. 29: Zellaufnahme von spezifischen Nanopartikeln (mit Transferrin) im Vergleich zur unspezifischen Kontrolle (Nanopartikel ohne Transferrin). Die NCI-Zellen (humane Myeloma Zelllinie) akkumulieren die spezifischen Partikel mehr als doppelt so stark wie die Kontroll-Partikel.

10

15

Die spezifischen Nanopartikel zeigen eine deutlich höhere Aufnahme durch die Myeloma NCI 929 Zellen. Die um über 50 % geringere Aufnahme der Nanopartikel ohne Targetpolymer demonstriert die Vorteile der erfindungsgemäßen Ausgestaltung der spezifischen Nanopartikel.

Anwendungsbeispiel E9

- 20 • Atherosklerose-Imaging am Watanabe-Kaninchen (Plaque-Darstellung)

Ziel: Darstellung von atherosklerotischen Plaques am Kaninchen mit Nanopartikeln, auf die nach dem Desorptions-Adsorptions-Verfahren ein Plaque-affines Peptid (Sekundärcoat, Targetpolymer) aufgebracht wurde.

25

Substanz:	Spezifische Nanopartikel (Beispiel D7)
Tiere:	Watanabe-Kaninchen
30 Dosierung:	200 μ Mol Fe/kg Körpergewicht (KGW)
Zeiten:	5 h p. i. (post injectionem)
MR-Technik:	
Gerät:	Siemens Magnetom 1,5 T

MR Ganzkörpertomograph mit
Extremitätenspule

MR-Parameter: Field of View (FOV) = 150 mm, Matrix =
256x256; Slice = 3 mm

5 Schichtorientierung = frontal

Sequenz 1: Protonendichte-betonte Spin-Echo Sequenz
(SE) mit TR = 2000 ms und TE = 15 ms

10 Sequenz 2: T2-gewichtete Gradienten-Echo-Sequenz
(GE) mit TR = 135 ms und TE = 15 ms; FA = 15°

Ex-vivo-Modell: Agarose-Phantom (s. Anwendungsbeispiel E1)

15 Die Aorta wurde herauspräpariert, vorsichtig aufgeschnitten und dann mit kalter PBS-Lösung gespült, um nicht-gebundene oder aufgenommene Nanopartikel zu entfernen. Anschließend wurde die Aorta in zwei Teile geteilt und im Agarose-Phantom eingegossen und dann MR-
20 tomographisch untersucht.

Histologie: Berliner-Blau Färbung

Ergebnisse:

25 Abb. 30: Ex vivo MR-tomographische Darstellung atherosklerotischer Plaques der Aorta eines Kaninchens mit der Modifikation D7 (Dosis 200 µmol Fe/kg; Resektion der Aorta 5 h p.i.); links Protonendichte-gewichtete Spin-Echo-Sequenz; rechts
30 T2*-gewichtete Gradienten-Echo-Sequenz.

Abb. 31: Histologischer Eisen-Nachweis in der atherosklerotischen Membran der Kaninchen-Aorta mit Berliner-Blau-Färbung. Die Gegenüberstellung mit der MR-tomographischen Aufnahme (GE 135/15/15°) zeigt, daß
35 sich das histologisch nachgewiesene Eisen an den Stellen befindet, an denen im Image das Signal

infolge der Anreicherung der spezifischen Nanopartikel deutlich reduziert ist. Resektion der Aorta 5 h nach intravenöser Applikation von 200 $\mu\text{mol Fe/kg}$ der spezifischen Partikel nach Beispiel D7.

- 5 Abb. 32: Histochemische Detektion (Berliner Blau Färbung) der
akkumulierten Nanopartikel nach Beispiel D7 in der
Aorta eines Watanabe Kaninchens. Die obere Abbildung
zeigt eine Übersicht der präparierten Aorta auf dem
Agar und der untere Teil demonstriert die gute
10 Korrelation der Eisenfärbung (blaue Granula) mit den
schon visuell erkennbaren Plaques im besonders stark
veränderten Aortenbogen.

- Die MR-tomographische Aufnahme ("Ex-vivo-Aufnahme") der
15 präparierten Aorta zeigt die Plaques als dunkle Flecken
(Signalreduktion). Der histologische Nachweis über die
Berliner Blau Färbung (Eisen) zeigt in der Gegenüber-
stellung mit der MR-tomographischen Aufnahme (GE
135/15/15°), daß sich das histologisch nachgewiesene
20 Eisen an den Stellen befindet, an denen im Image das
Signal infolge der Nanopartikel-Anreicherung deutlich
reduziert ist. Die Befundung aus der MR-Aufnahme
korreliert mit den schon visuell deutlich erkennbaren
Plaques. Die größten Plaques befinden sich im Bereich des
25 Aortenbogens und bestätigt sich in der MR-tomographischen
Aufnahme und der histologischen Ansicht; auch kleinere
Plaques sind sowohl im MR-Bild als auch mit der
histologischen Eisenfärbung gut detektierbar.

30

Anwendungsbeispiel E10

- Tumoranreicherung an der tumortragenden Maus

Ziel: Es sollte gezeigt werden, daß die erfindungs-
gemäßen Nanopartikel sich in Tumoren anreichern können.

- 35 Die Untersuchungen sollen zum einen zeigen, daß die

Partikel geeignete Arzneistoffträger für Chemotherapeutika darstellen und zum anderen dokumentieren, daß mit Hilfe der Nanopartikel kontrolliert werden kann, ob die Therapeutika ihren gewünschten Wirkort, also den Tumor, überhaupt erreichen können, so daß hier ein Beispiel für die Kombination von Diagnose und Therapie vorliegt.

Substanz: Spezifische Nanopartikel (Beispiel D2);
Tiere: Nacktmaus (Swiss nude) mit implantiertem Tumor (n = 5/Dosis)
(LS 174T, s. c. - Applikation 10 Tage vor Versuchsbeginn)
Narkose: Rompun/Ketavet (1:1), ca. 0.5 ml pro kg Körpergewicht i.m.
Dosierung: 200 µMol Fe/kg Körpergewicht (KGW)
Zeiten: 0 - 120 Minuten und 12 bzw. 24 Stunden nach Applikation.
MR-Methode:
Gerät: Siemens Magnetom 1,5 T
MR Ganzkörpertomograph mit Extremitätenspule
MR-Parameter: Field of View (FOV) = 150 mm, Matrix = 256x256; Slice = 3 mm
Schichtorientierung = frontal
Sequenz 1: Protonendichte-betonte Spin-Echo-Sequenz (SE) mit TR = 2000 ms und TE = 15 ms
Sequenz 2: Dynamische Aufnahmen: SE-Sequenz mit TR/TE = 300 ms/15 ms
MR-Auswertung: Signalintensitäten in benutzerdefinierten Regions of Interest von Tumor, Muskel, Fett und Background. Die relativen Signalintensitäten in den verschiedenen Geweben werden standardisiert auf die Signalintensität im Fett kalkuliert.

Ergebnisse

Abb. 33: Transversale T1-gewichtete Spin-Echo Dynamik-Studie (TR: 300 ms, TE: 15 ms) des tumoralen Signalverhaltens nach Bolusinjektion von Nanopartikeln nach Beispiel D2 (200 $\mu\text{mol Fe/kg}$). Die Aufnahmen zeigen ein zeitabhängig langsam ansteigendes Signal-Enhancement (Anreicherung) im Tumor mit deutlich zunehmender Abgrenzung der Raumforderung.

Abb. 34: Verlauf der relativen Signalintensität (Anreicherung) im Tumor. Der zeitliche Signalverlauf (Enhancement) für eine Dosis von 200 $\mu\text{mol/kg}$ Kgw verdeutlicht das starke und mit der Zeit zunehmende Enhancement (zunehmende Anreicherung) im Tumor (SE 2000/15).

Abb. 35: Zeitabhängige transversale Protonen-Dichte-gewichtete (SE 2000/15) Aufnahmen nach Applikation der Nanopartikel nach Beispiel D2 (200 $\mu\text{mol Fe/kg}$).

In der T1-gewichteten und in der Protonen-Dichte-gewichteten Spin-Echo-Sequenz ist eine zunehmende Akkumulation der Nanopartikel im Tumor mit zeitabhängig linear ansteigendem Signalenhancement festzustellen (Abb. 33; 35). Bis 135 min nach Injektion wird ein 35 - 40 %iges Enhancement beobachtet, was eine deutliche Abgrenzung des Tumors vom gesunden Gewebe erlaubt und die Anreicherung der Nanopartikel bestätigt. Im Gegensatz zu den hier gemachten Beobachtungen wurde bei angiographischen Untersuchungen festgestellt, daß ein durch die Perfusion verursachtes Enhancement im Tumor schon nach spätestens 30 min (p.i.) wieder vollständig abgeklungen ist.

5

Patentansprüche

- 10 1. Nanopartikel, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einem Eisen enthaltenden Kern, einem Primärcoat (Synthesepolymer) und einem Sekundärcoat (Target-polymer) sowie gegebenenfalls pharmazeutischen Hilfsstoffen, Pharmaka und/oder Adsorptionsvermittlern bestehen.
- 15 2. Nanopartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der hydrodynamische Durchmesser des Grundbausteins aus Eisen enthaltendem Kern und Primärcoat in Lösung kleiner als 100 nm und höchstens fünfmal so groß wie der Durchmesser des Eisen enthaltenden Kerns ist.
- 20 3. Nanopartikel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Eisen enthaltende Kern Magnetit oder Maghämmit ist oder mindestens eine dieser Verbindungen enthält.
- 25 4. Nanopartikel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß bis zu 25 Gew.-% des im Kern enthaltenen Eisens durch andere Metallionen ersetzt sind.
- 30 5. Nanopartikel nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nicht-Eisen-Metallionen paramagnetisch, diamagnetisch oder eine Mischung para- und diamagnetischer Metallionen sind.
- 35

6. Nanopartikel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Eisen enthaltende Kern einen durch Elektronenmikroskopie bestimmten Durchmesser von kleiner als 30 nm aufweist und mindestens 50 Metallatome enthält sowie eine Partikelgrößenverteilung, wobei mindestens 90 % der Eisen enthaltenden Kerne im Bereich $0,7 \cdot \text{Mittelwert}$ bis $1,3 \cdot \text{Mittelwert}$ liegen, aufweist.

7. Nanopartikel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Synthesepolymer in einer Menge zwischen dem 0,01-fachen und dem 1-fachen der Summe der vorhandenen Metallionen enthalten.

8. Nanopartikel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Synthesepolymer eine monomere oder polymere Substanz oder ein Gemisch dieser Substanzen oder Derivate, oder Derivate mit funktionellen Gruppen, oder Derivate, die zusätzlich substituiert worden sind, mit einem Molekulargewicht kleiner 100.000 Da, darstellt.

9. Nanopartikel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Synthesepolymer ein Dextranderivat oder eine Mischung von Dextran und/oder Dextranderivaten darstellt.

10. Nanopartikel nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Synthesepolymer eine oder mehrere Säuregruppen im Molekül, oder mehrere funktionelle Gruppen, die N, S, P oder O-Atome enthalten, im Molekül aufweist.

11. Nanopartikel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Targetpolymer und das Synthesepolymer gleiche oder unterschiedliche Substanzen oder Substanzgemische darstellen.
- 5
12. Nanopartikel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Targetpolymer in einer Gewichtsmenge zwischen dem 0,5-fachen bis 50-fachen des Gewichts der vorhandenen Metallionen enthalten.
- 10
13. Nanopartikel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie Adsorptionsvermittler enthalten, deren Menge kleiner oder gleich der Summe des Gewichtes der enthaltenen Metallionen ist.
- 15
14. Nanopartikel nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Adsorptionsvermittler Peptide enthalten.
- 20
15. Nanopartikel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß der hydrodynamische Durchmesser aller Bestandteile höchstens zehnmal größer als der Durchmesser des Eisen enthaltenden Kerns und höchstens 20 % größer als der Durchmesser des Grundbausteins ist.
- 25
16. Nanopartikel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einzelnen Modulen wie Grundbaustein, Targetpolymer, Pharmakon und Adsorptionsvermittler bestehen, die jederzeit kombinierbar sind.
- 30
17. Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in einem
- 35

ersten Schritt ein Eisen enthaltender Kern in Anwesenheit eines Synthesepolymers durch Basenbehandlung hergestellt wird, in einem zweiten Schritt das Verhältnis von Eisen zu Synthesepolymer durch ein Desorptionsverfahren verändert wird und in einem dritten Schritt ein Targetpolymer adsorbiert wird und gegebenenfalls Adsorptionsvermittler, pharmazeutische Hilfsstoffe und/oder Pharmaka zugesetzt werden.

10 18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß zur Herstellung des Eisen enthaltenden Kerns ein Eisen-II-, Eisen-III-Salz-Gemisch verwendet wird, wobei das Verhältnis von divalentem zu trivalentem Eisen 1:1 bis 1:20 beträgt.

15 19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß zur Herstellung des Eisen enthaltenden Kerns ein Eisen-III-Salz-Gemisch in Kombination mit einem Reduktionsmittel verwendet wird, wobei die Menge an Reduktionsmittel so gewählt ist, daß das generierte Eisen-II zu Eisen-III-Verhältnis 1:1 bis 1:20 beträgt.

20 20. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 17 bis 25 19, dadurch gekennzeichnet, daß die verwendeten Eisenverbindungen beliebige Mischungen aus anorganischen und organischen Salzen sowie Komplexen davon darstellen.

30 21. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 17 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Eisen enthaltenden Kristalle durch Mischung der zuvor getrennt hergestellten Eisen-II-hydroxid- und Eisen-III-hydroxid-Lösungen hergestellt werden.

35

22. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 17 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß bis zu 25 Gew.-% der eingesetzten Metallionen Nicht-Eisen-Ionen sind.
- 5 23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Nicht-Eisen-Metallionen paramagnetisch, diamagnetisch oder eine Mischung para- und diamagnetischer Metallionen sind.
- 10 24. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 17 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß als Synthesepolymer Substanzen oder Kombinationen verschiedener Substanzen verwendet werden, welche die während der Ausfällung entstehenden Kristalle voneinander
- 15 separieren, wobei die Menge an Synthesepolymer im Reaktionsgemisch, relativ zum Gewicht der enthaltenen Metallionen, 0,5 bis 20-fach höher liegt, aber insgesamt weniger als 50 % (g/v) im Reaktionsgemisch beträgt.
- 20 25. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 17 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ausfällung der Eisenverbindungen eine 0,1 bis 10 N Base eingesetzt wird, deren Zugabe schnell erfolgt.
- 25 26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ausfällung der Eisenverbindungen Ammoniak als Gas oder Salz, ein Amin oder ein Aminderivat eingesetzt wird.
- 30 27. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 17 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Synthese des Grundbausteins in einem Temperaturbereich zwischen 0° - 120°C erfolgt.
- 35

28. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 17 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis von Eisen zu Synthesepolymer auf ein Gewichtsverhältnis von 1:0,01 bis 1:1 eingestellt wird.

5

29. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 17 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Menge an zugesetztem Targetpolymer so gewählt ist, daß das Verhältnis der enthaltenen Metallionen zu dem Targetpolymer 1:0,5 bis 1:50 beträgt.

10

30. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 17 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Nanopartikel als stabile kolloidale Sole oder lyophilisiert vorliegen und mit medizinisch verwendeten Lösungsmitteln wieder in Lösung gebracht werden können oder daß der Grundbaustein, Targetkomponente und gegebenenfalls Zusätze getrennte Lösungen oder Lyophilisate sind, die erst zu einem bestimmten Zeitpunkt zur Applikationslösung zusammengemischt werden.

15

20

31. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 17 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß die einzelnen Module der Nanopartikel jederzeit kombinierbar sind.

25

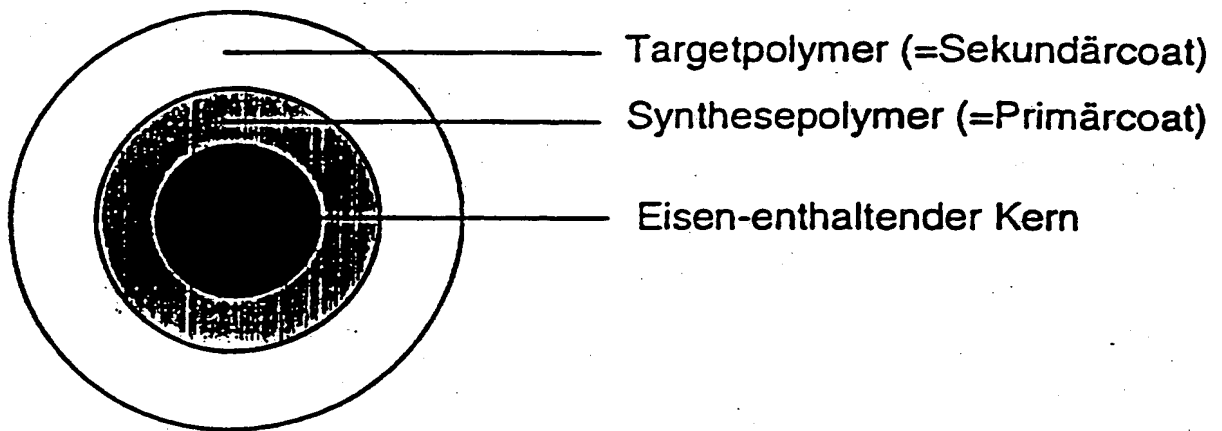
32. Verwendung der Nanopartikel als Kontrastmittel in der Diagnostik als visuelle Markersubstanz in der chirurgischen Medizin und/oder als Arzneistoffträger oder Wirkstoff in der Therapie.

30

35

Abbildungen

Abbildung 1:

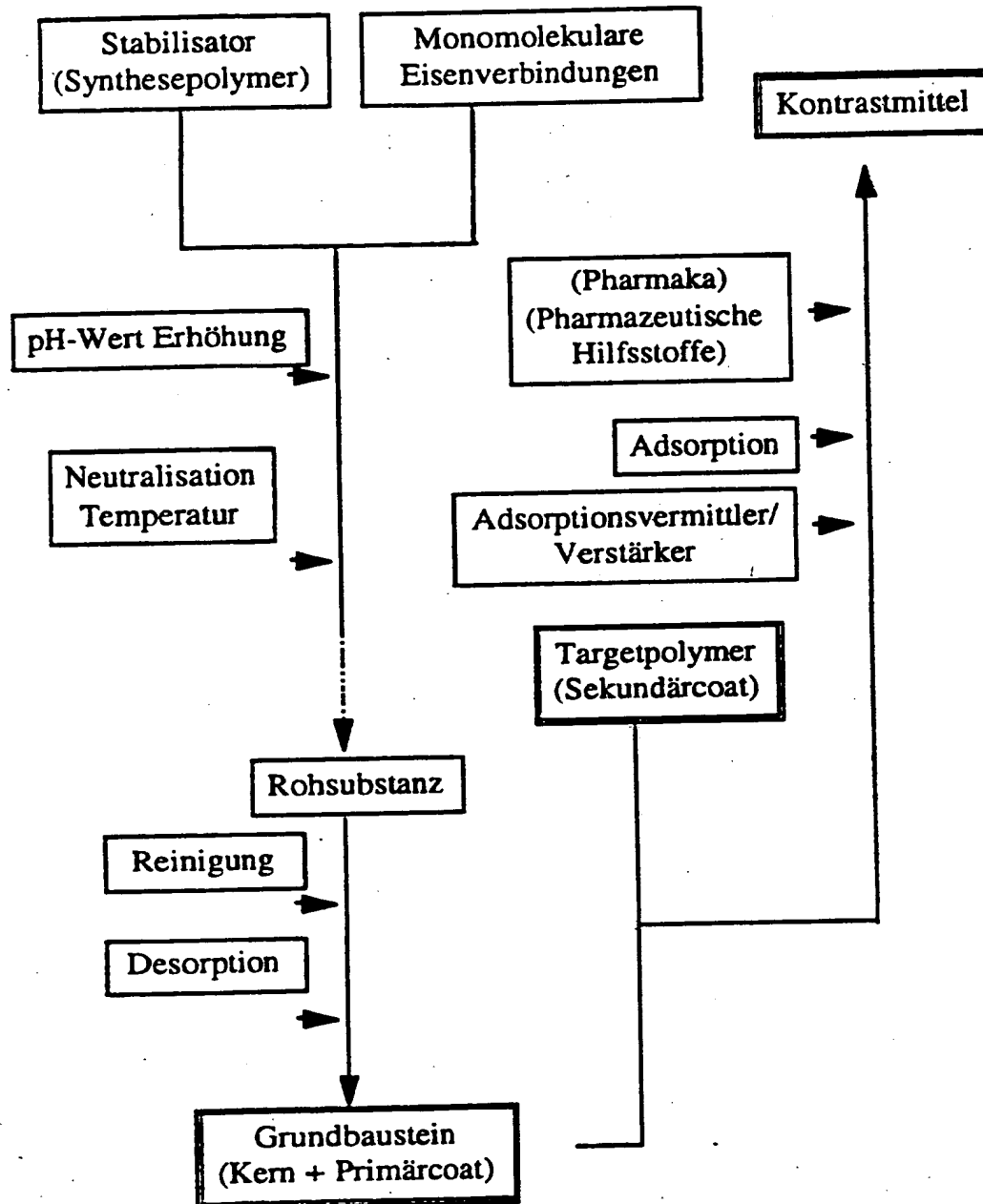


Schematischer Aufbau der erfindungsgemäßen Nanopartikel. Die Kombination von Eisen-enthaltendem Kern + Primärcoat (Grundbaustein) mit dem Targetpolymer (Sekundärcoat) kann zu einem beliebigen Zeitpunkt erfolgen. Der Grundbaustein bestimmt die physikalische Qualität während das Targetpolymer (Sekundärcoat) die Oberfläche des Nanopartikels bildet und das In-vivo-Verhalten bestimmt.

Optional kann die adsorptive Bindung zwischen Primär- und Sekundärcoat durch die Verwendung von Adsorptionsvermittlern verbessert oder erst ermöglicht werden. Nicht dargestellt ist die Option zusätzlich pharmazeutische Hilfsstoffe oder auch Pharmaka zu adsorbieren.

Abbildung 2:

Herstellungsschema der erfindungsgemäßen Nanopartikel.



Schematische Darstellung der allgemeinen Herstellung der erfindungsgemäßen Nanopartikel. Die Vielzahl der möglichen Varianten, z. B. zur Herstellung der Rohsubstanzen, läßt sich graphisch nicht darstellen, aber sowohl der modulare Aufbau als auch die Herstellung der fertigen Nanopartikel aus unterschiedlichen Bausteinen. Wesentlich ist die getrennte Herstellung des Grundbausteins mit dem Primärcoat und des Targetpolymers.

3/31

Abbildung 3:

FTIR-Spektrum vom Synthesepolymer in KBr nach Beispiel A1 (Mono-Carboxydextran). Das Signal um 1730 cm^{-1} bestätigt die Generierung der Carboxylgruppen. Zum Vergleich ist in der unteren Abbildung das Spektrum der Ausgangsverbindung Dextran 4 (Serva) gezeigt.

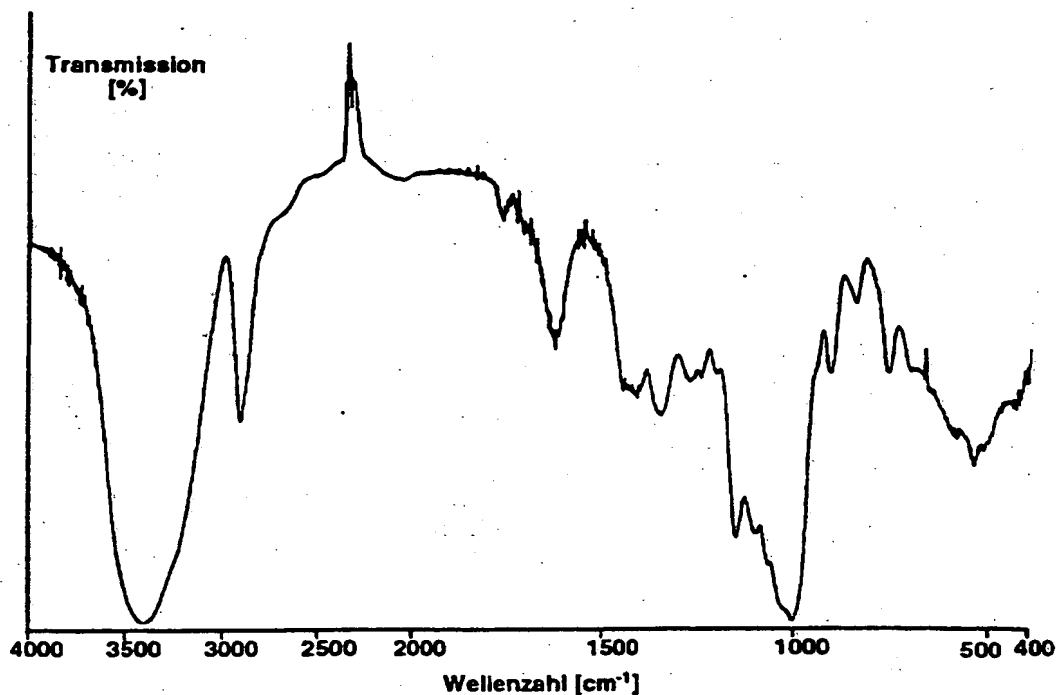
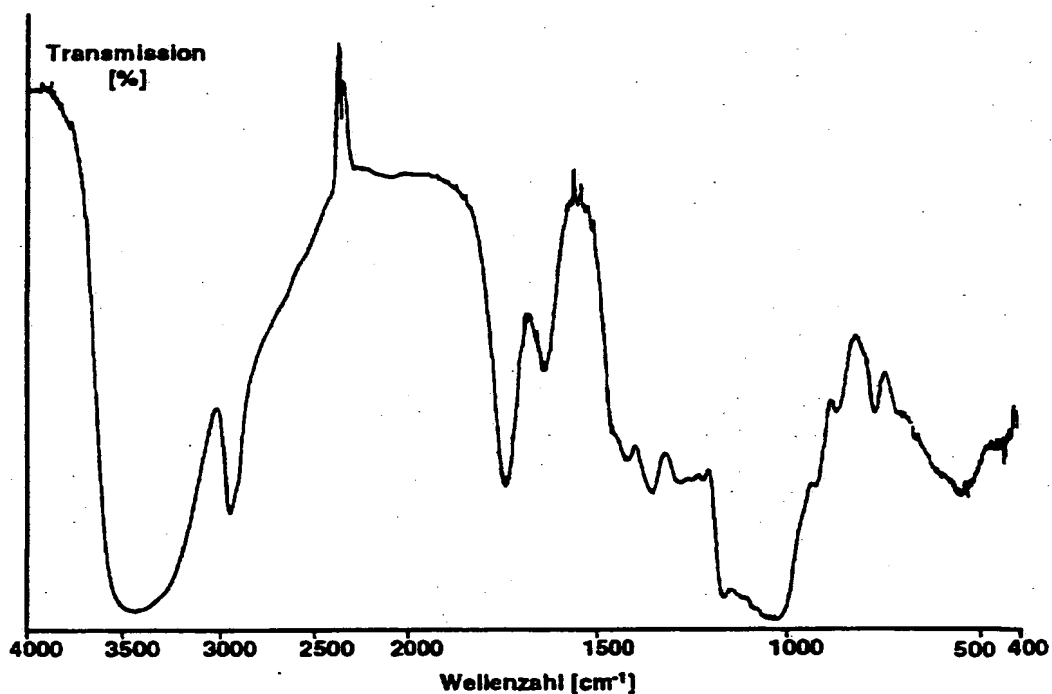
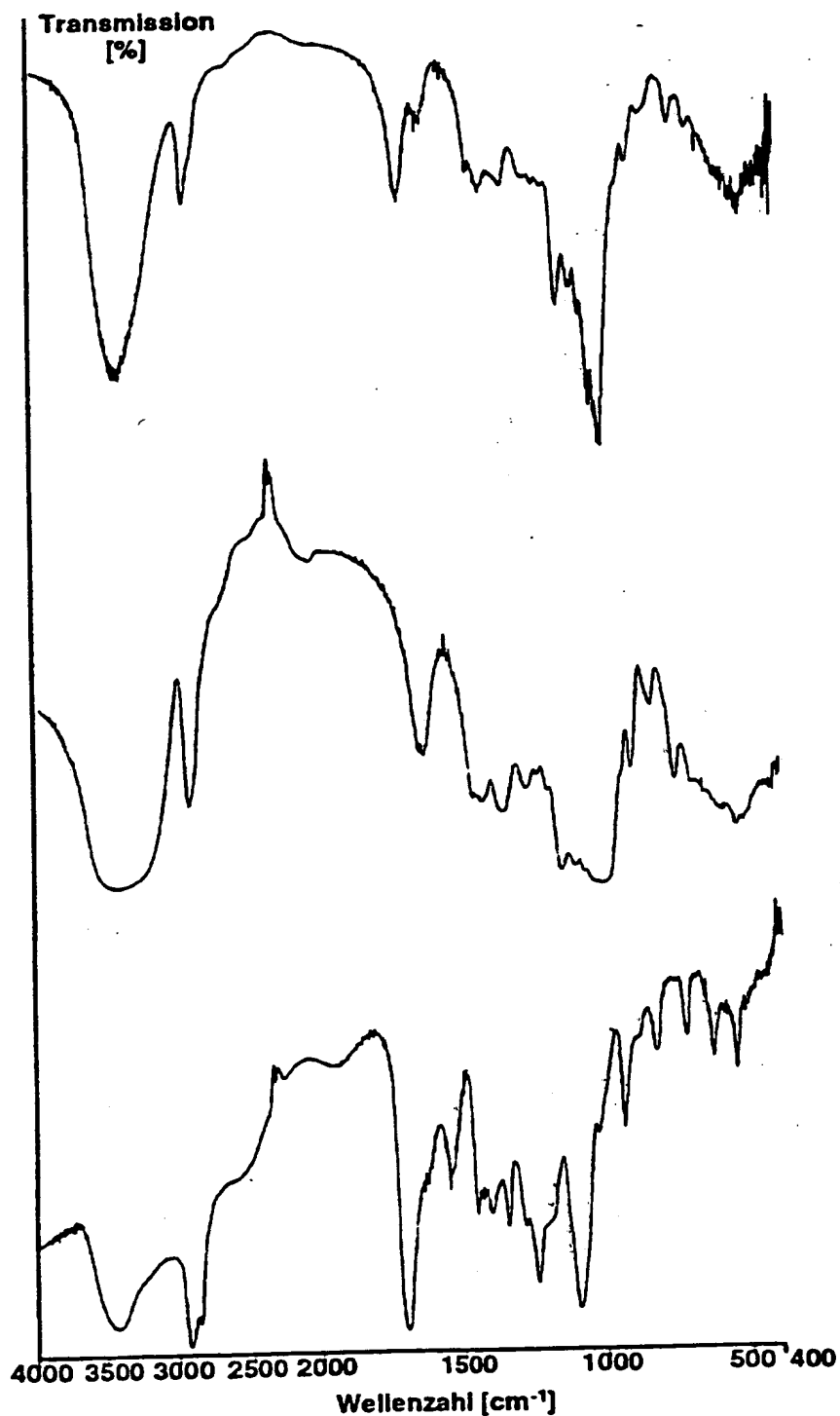


Abbildung 4:

FTIR-Spektrum vom Synthesepolymer in KBr nach Beispiel A2 (Poly-Carboxydextran). Zum Vergleich sind die Spektren der Ausgangssubstanzen Dextran T10 (Pharmacia, Mitte) und 6-Bromhexansäure (Sigma, Unten) gezeigt.



Abbildungen 5-7:

MR-Lymphographie an der Ratte (Anwendungsbeispiel E1)

Vergleich der relativen Signalintensitäten in verschiedenen Lymphknoten/ Lymphknotengruppen zwischen der Ausgangsverbindung (Synthesepolymer = Targetpolymer) und einer nach dem Desorptions-Adsorptions-Verfahren hergestellten Modifikation (Synthesepolymer \neq Targetpolymer).

Substanz: Spezifische Nanopartikel (Beispiel D5);
Vergleich = Grundbaustein nach Beispiel C1
(= D5 ohne Targetpolymer)

Dosierung: 100 μ Mol Fe/kg Körpergewicht (KGW)

Zeiten: 24 h p. i. (post injectionem)

Methode: MR-Tomographie in SE und GE-Technik
(s. Text zum Beispiel E1)

Ex-vivo-Modell: Agarose-Phantom
(s. Text zum Beispiel E1)

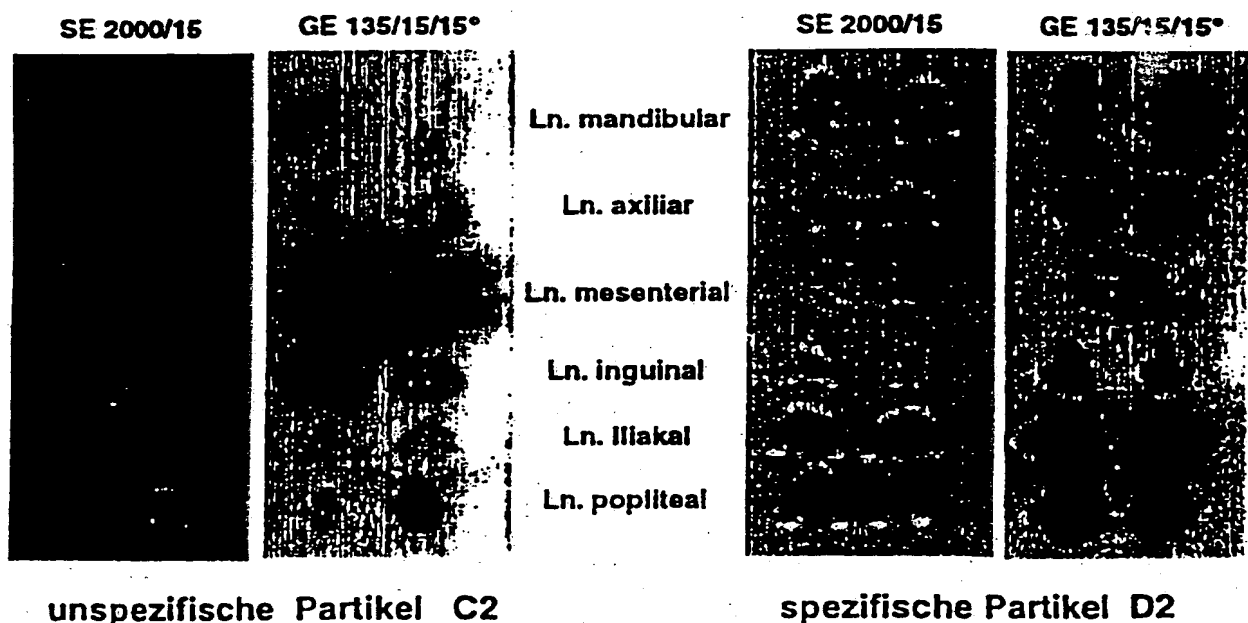


Abb. 5: MR-Aufnahmen von in Agarose-eingebetteten Rattenlymphknoten; Resektion 24 h nach Applikation von der Vergleichssubstanz (Beispiel C1, links) bzw. der spezifischeren Substanz nach Beispiel D5 (rechts); Dosis jeweils 100 μ mol Fe/kg.

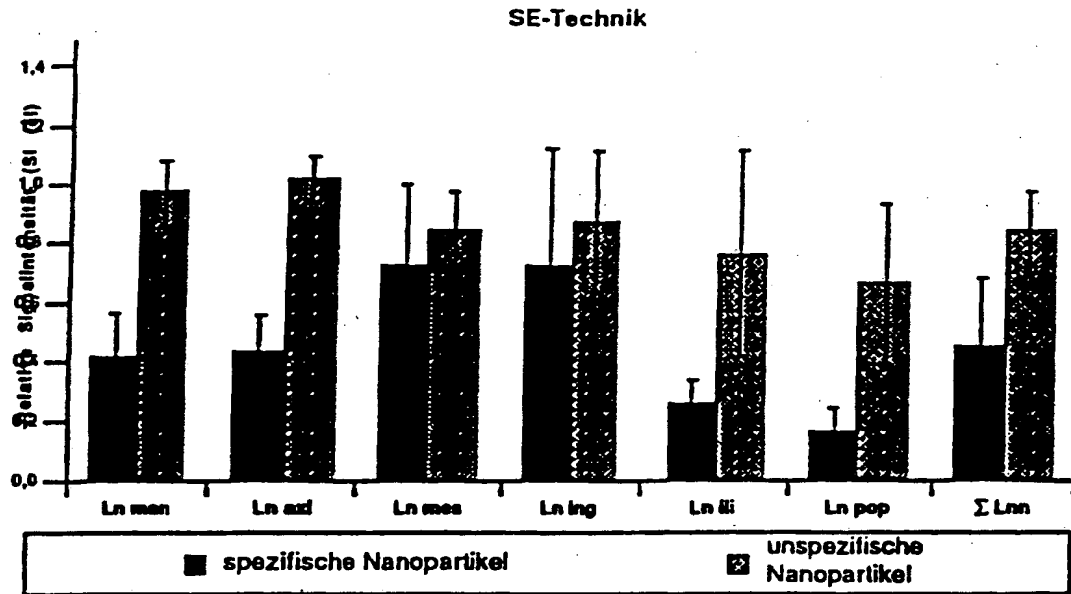


Abb. 6: Spezifische Nanopartikel vs. Ausgangssubstanz: Quantitative Auswertung (aus Abb. 5) der relativen Signalintensitäten für SE 2000/15 in verschiedenen Lymphknoten der Ratte 24 h nach Magnetit-Applikation (100 μ mol Fe/kg).

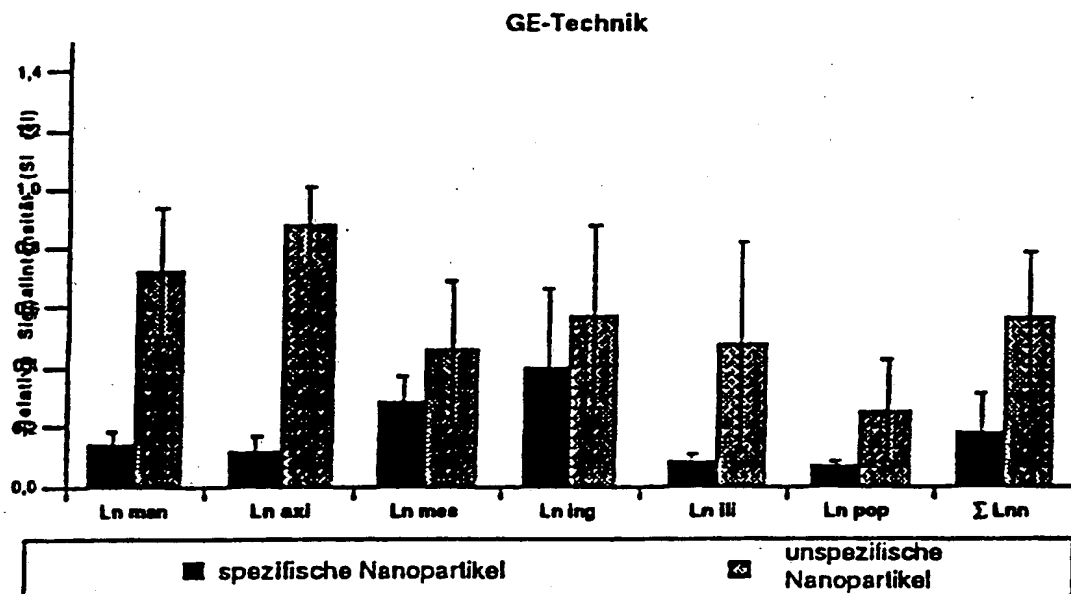


Abb. 7: Spezifische Nanopartikel vs. Ausgangssubstanz: Quantitative Auswertung (aus Abb. 5) der relativen Signalintensitäten GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten der Ratte 24 h nach Magnetit-Applikation (100 μ mol Fe/kg).

Die Auswertung über die Beeinflussung der relativen lymphnodalen Signalintensität (Abb. 5,7 = SE; Abb. 6 = GE) von der modifizierten Charge bzw. der

Originalsubstanz demonstriert eindrucksvoll die bessere Anreicherung der modifizierten Substanz in den Lymphknoten. Die lymphonodale Signalreduktion von mandibularen, axiliaren, iliakalen, poplitealen Lymphknoten sowie der mittleren Anreicherung über alle Lymphknoten-Gruppen durch die Laminarin-modifizierte Charge unterscheidet sich signifikant (gepaarter t-Test nach Student, Signifikanzniveau $p < 0,05$) von der unspezifischen Ausgangsverbindung C1 (Abb. 6 und 7).

Abbildung 8 - 15:**MR-Lymphographie am Kaninchen (Anwendungsbeispiel E2)**

Vergleich der relativen Signalintensität in verschiedenen Lymphknoten/ Lymphknotengruppen zwischen der Ausgangsverbindung und einer nach dem Desorptions-Adsorptions-Verfahren hergestellten Modifikation.

Substanz: Spezifische Nanopartikel = Beispiel D2;
Vergleich = Beispiel C2 (= D2 ohne Targetpolymer)

Dosierung: 150 $\mu\text{Mol Fe/kg}$ Körpergewicht (KGW)

Zeiten: 24 h p. i. (post injectionem)

Methode: MR-Tomographie in SE und GE-Technik
(s. Text zum Beispiel E2)

In-vivo-Modell: Kaninchen mit stimulierten Lymphknoten
(s. Text zum Beispiel E2)

Ex-vivo-Modell: Agarose-Phantom
(s. Text zum Beispiel E2)

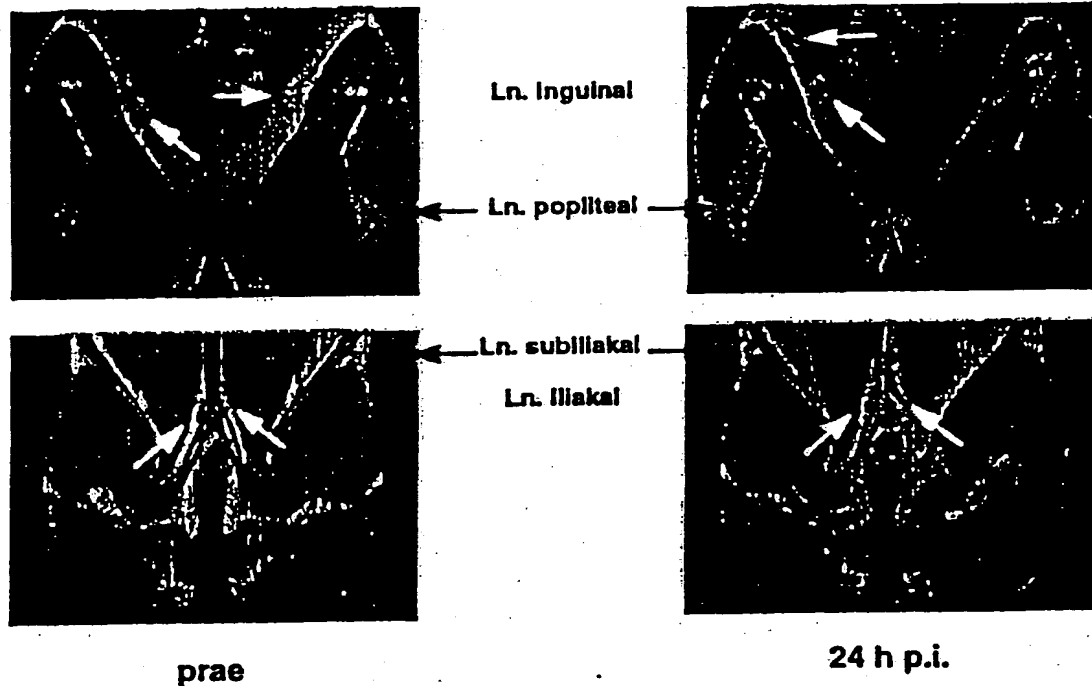


Abb. 8: Frontale prae- und post-Kontrast MR-Aufnahmen der Beckenregion des Kaninchens in der Protonen-Dichte gewichteten Spin-Echo-Sequenz (SE 2000/15). (links: prae-Kontrast; rechts: spezifische Substanz D2 (150 $\mu\text{mol Fe/kg}$)).

9/31

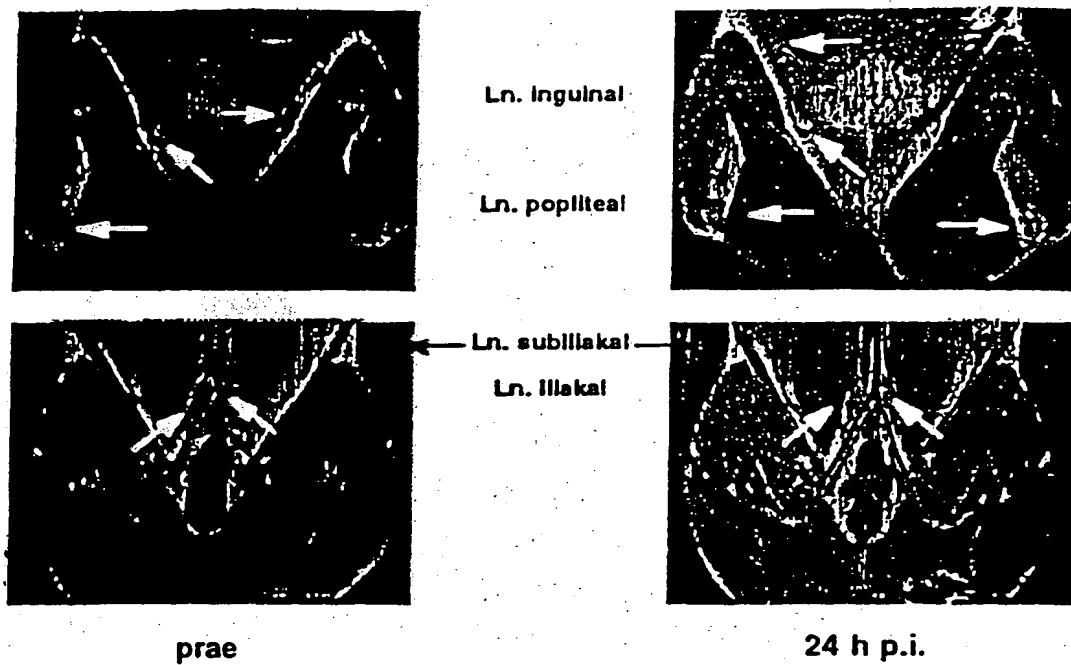


Abb. 9: Frontale prae- und post-Kontrast MR-Aufnahmen der Beckenregion des Kaninchens in der Protonen-Dichte gewichteten Spin-Echo-Sequenz (SE 2000/15). (links: prae-Kontrast; rechts: Ausgangsverbindung C2 (150 $\mu\text{mol Fe/kg}$)).

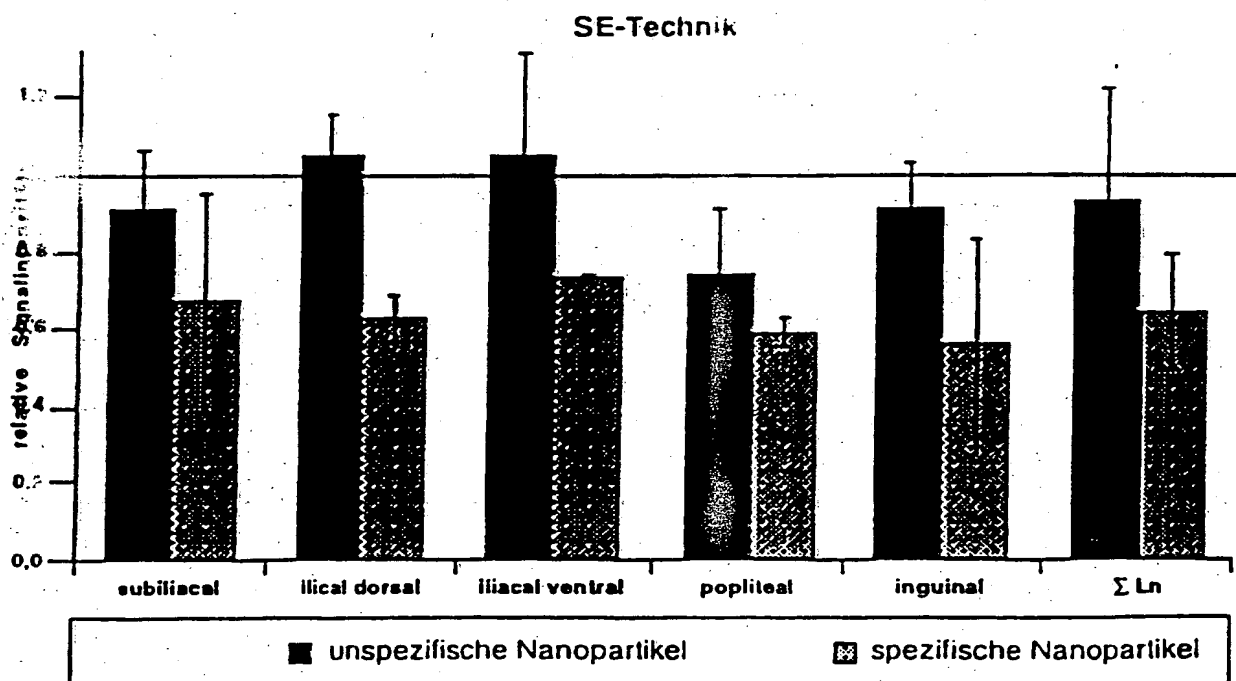


Abb. 10: Spezifische Nanopartikel vs unspezifische Ausgangspartikel: Relative Signalintensitäten für SE 2000/15 in verschiedenen Lymphknoten des Kaninchens 24 h p.i. (150 $\mu\text{mol Fe/kg}$, $n=3$). (Quantitative Auswertung nach Abb. 8 und 9).

10/31

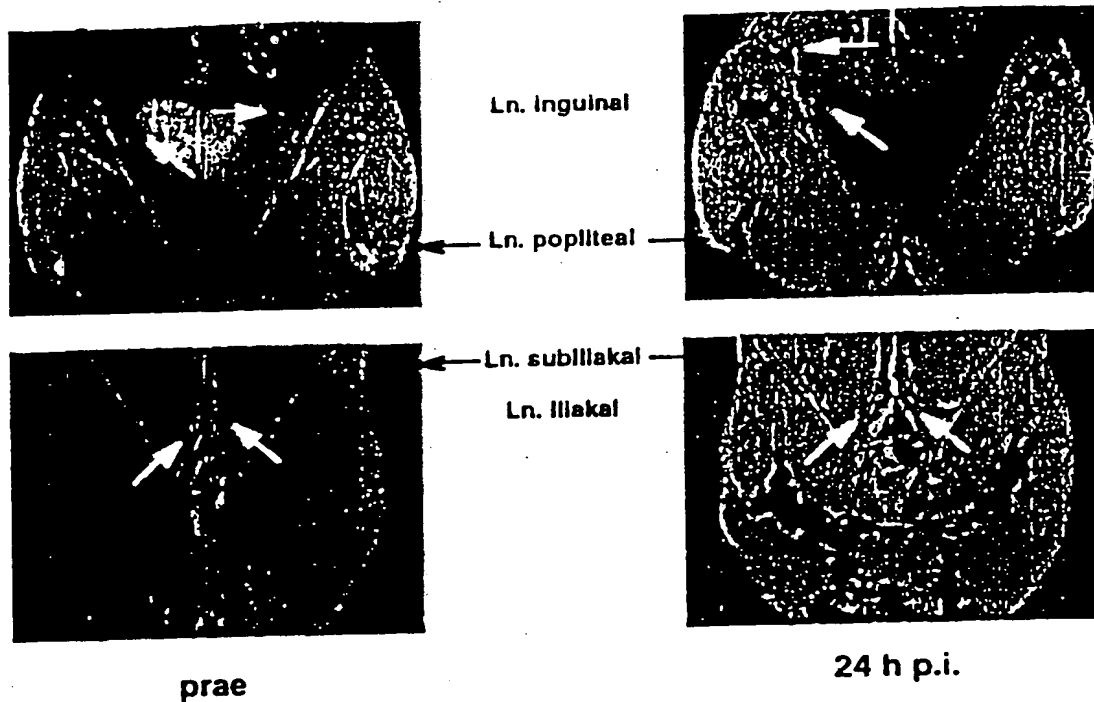


Abb. 11: Frontale prae- und post-Kontrast MR-Aufnahmen der Beckenregion des Kaninchens in der T2*-gewichtete Gradienten-Echo-Sequenz (GE 135/15/15°). (links: prae-Kontrast; rechts: spezifische Substanz D2 (150 µmol Fe/kg)).

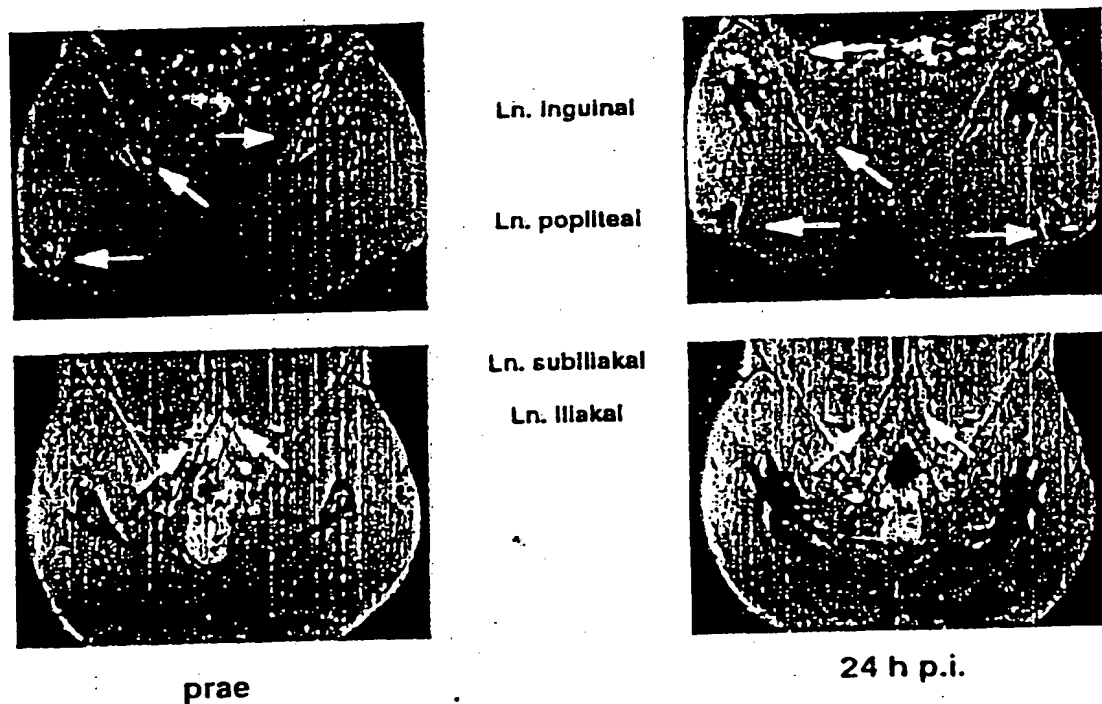


Abb. 12: Frontale prae- und post-Kontrast MR-Aufnahmen der Beckenregion des Kaninchens in der T2*-gewichtete Gradienten-Echo-Sequenz (GE 135/15/15°). (links: prae-Kontrast; rechts: Ausgangsverbindung C2 (150 µmol Fe/kg)).

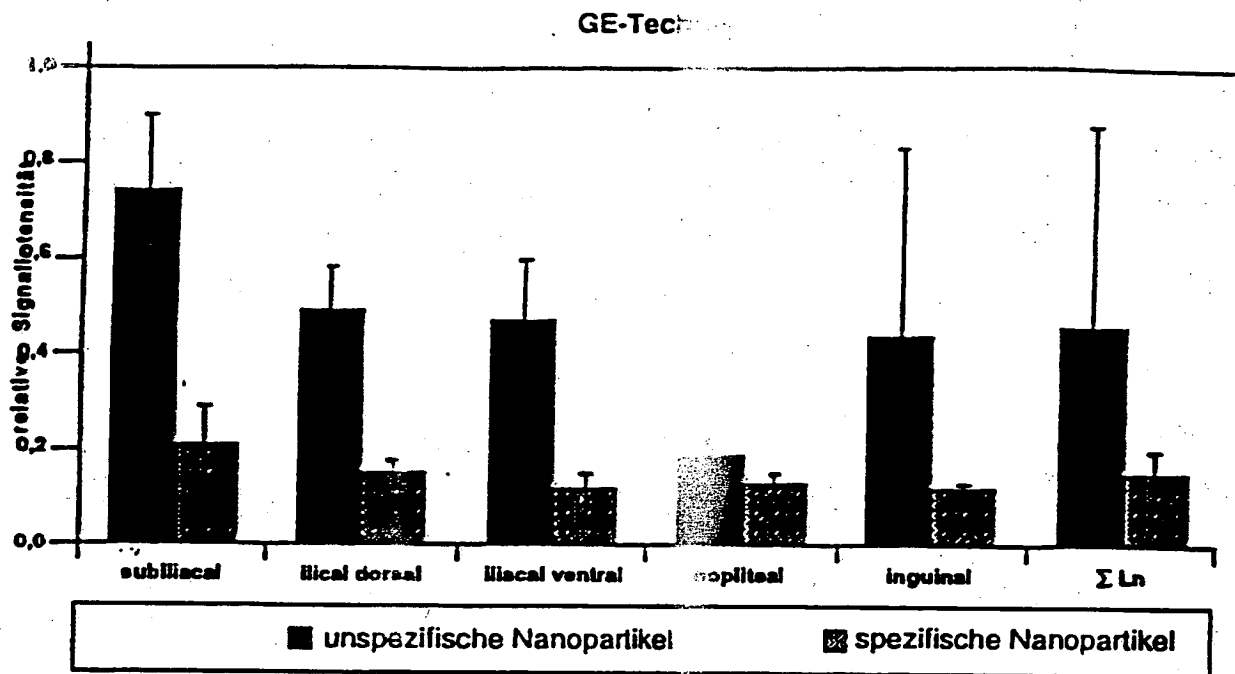
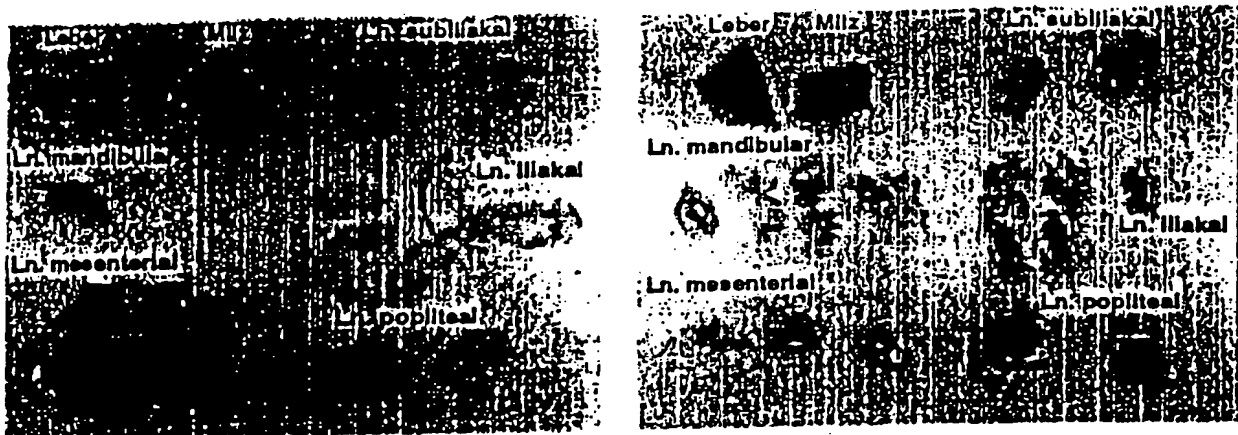


Abb. 13: Spezifische Nanopartikel vs unspezifische Ausgangspartikel: Relative Signalintensitäten für GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten des Kaninchens 24 h p.i. (150 μ mol Fe/kg, n=3). (Quantitative Auswertung der Abb. 11 und 12)

Die Auswertung der Beeinflussung der relativen lymphonodalen Signalintensität (Abb. 8, 9 = SE; Abb. 11, 12 = GE) durch die spezifischen Nanopartikel bzw. die Ausgangspartikel demonstriert die homogenere Signalreduktion der Lymphknoten durch die modifizierte Substanz. Die lymphonodale Signalreduktion in (GE-Sequenz) von subiliacalen, iliakalen und poplitealen Lymphknoten sowie der mittleren Anreicherung über alle Lymphknoten-Gruppen durch die FP1-modifizierten Nanopartikel unterscheidet sich signifikant (gepaarter T-Test, $p < 0,05$) von den unmodifizierten Vergleichspartikeln (Abb. 13). Die homogenere interlymphonodale Signalbeeinflussung (Abb. 15) der spezifischen Partikel ist auch deutlich in den MR-tomographischen Aufnahmen der Agarose-eingebetteten Lymphknoten zu erkennen; hier zeigt die Vergleichssubstanz, wie auch bei der Ratte beobachtet, eine starke, aber auf die mesenterialen Lymphknoten beschränkte Signalreduktion (Abb. 14).

12/31

- GRE 135/15/15° -



unspezifische Nanopartikel C2

spezifische Nanopartikel D2

Abb. 14: Ex vivo MR-Aufnahmen (GE-Sequenz) von Agarose-eingebetteten Lymphknoten des Kaninchens; Dosis - 150 $\mu\text{mol Fe/kg}$; links: unspezifische Vergleichspartikel; rechts: spezifische Nanopartikel.

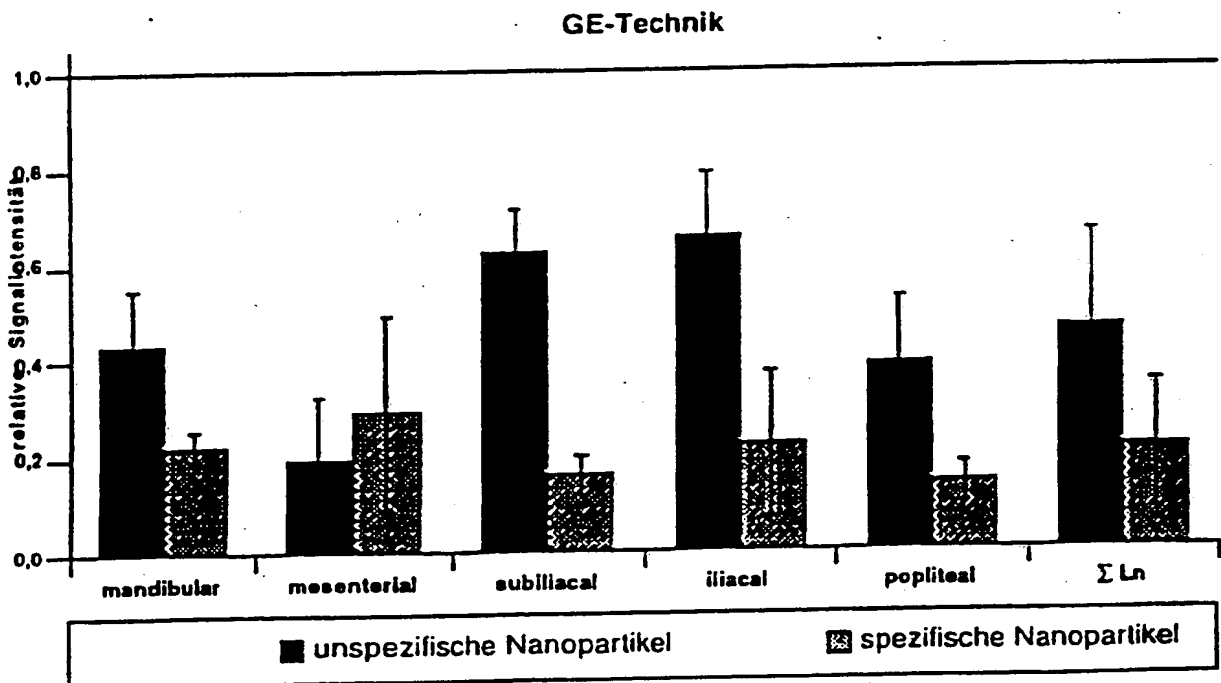


Abb. 15: Spezifische Nanopartikel vs unspezifische Ausgangspartikel: Relative Signalintensitäten für GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten des Kaninchens 24 h p.i. (150 $\mu\text{mol Fe/kg}$, n=3).

Abbildung 16 - 17

Dosisabhängigkeit der Lymphknoten-anreicherung an der Ratte
(Anwendungsbeispiel E3)

Vergleich der relativen Signalintensität in verschiedenen Lymphknoten/Lymphknotengruppen zwischen der Ausgangsverbindung (Synthesepolymer = Targetpolymer) und einer nach dem Desorptions-Adsorptions-Verfahren hergestellten Modifikation (Synthesepolymer Targetpolymer) in Abhängigkeit der applizierten Dosis.

Substanz: Spezifische Nanopartikel = Beispiel D2;
 Vergleich = Beispiel C2
 Dosierung: 50 -200 μ Mol Fe/kg Körpergewicht (KGW) (n=3 /Gruppe)
 Zeiten: 24 h p. i. (post injectionem)
 Methode: (s. Text zum Beispiel E3)
 Ex vivo Modell: (s. Text zum Beispiel E3)

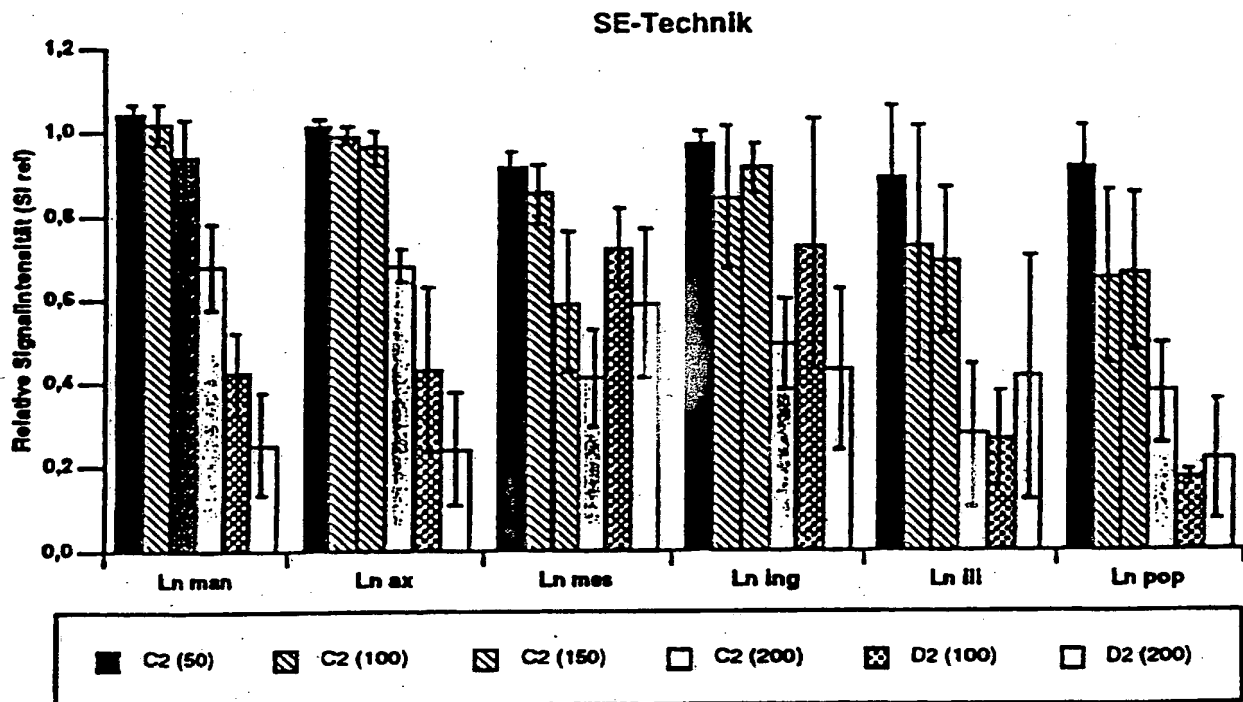


Abb. 16: Spezifische Nanopartikel nach Beispiel D2 vs Ausgangspartikel nach Beispiel C2: Relative Signalintensitäten in Abhängigkeit der applizierten Dosis für SE 2000/15 in verschiedenen Lymphknoten der Ratte 24 h nach Magnetit-Applikation.

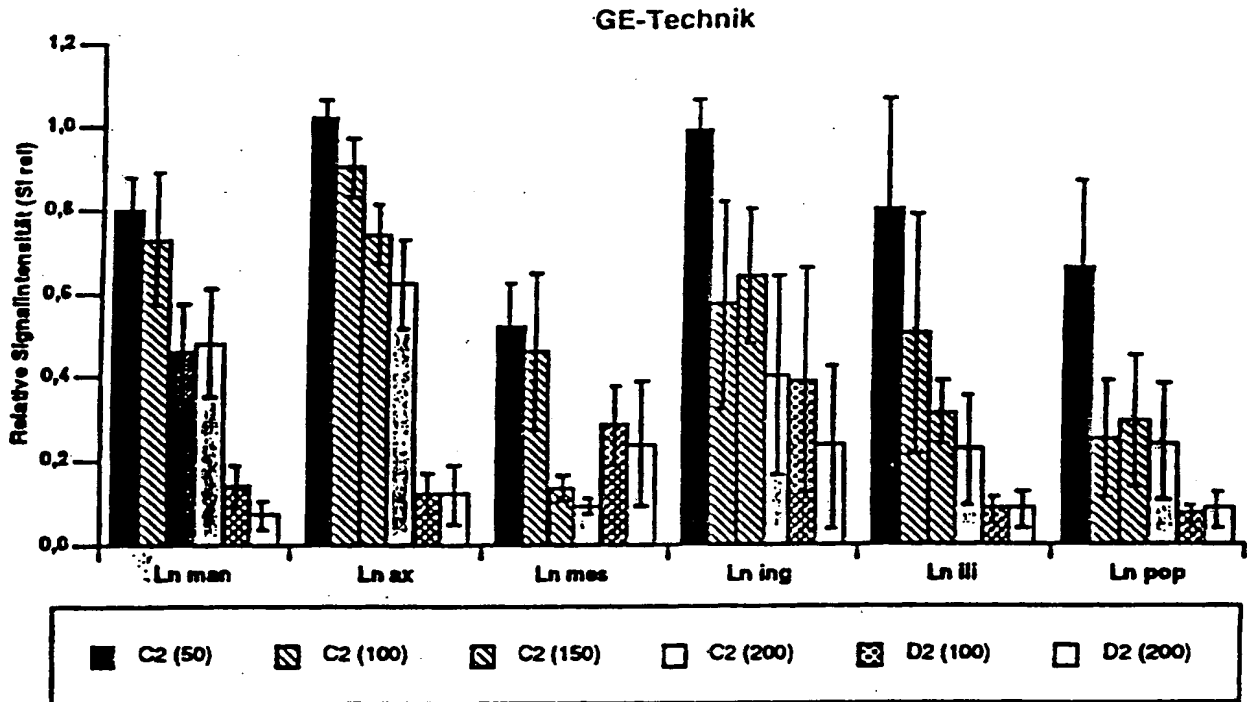


Abb. 17: Spezifische Nanopartikel nach Beispiel D2 vs Ausgangspartikel nach Beispiel C2: Relative Signalintensitäten in Abhängigkeit der applizierten Dosis für GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten der Ratte 24 h nach Magnetit-Applikation.

In allen Lymphknotengruppen mit Ausnahme der mesenterialen und inguinalen Lymphknoten zeigt sich eine signifikant ($p < 0,05$) bessere Signalreduktion durch die nach Beispiel D2 modifizierten spezifischen Nanopartikel schon bei halb so hoher Dosierung (200 $\mu\text{mol Fe/kg}$ (C2) vs 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$ (D2). Diese deutlichen Unterschiede zeigen sich auch, wenn man die mittlere Signalbeeinflussung über alle Lymphknotenstationen gemittelt betrachtet.

Abbildungen 18 - 21

Zeitabhängigkeit der Lymphknoten-anreicherung (Anwendungsbeispiel E4)

Vergleich der relativen Signalintensität in verschiedenen Lymphknoten/Lymphknotengruppen zwischen der Ausgangsverbindung (Synthesepolymer = Targetpolymer) und einer nach dem Desorptions-Adsorptions-Verfahren hergestellten Modifikation (Synthesepolymer Targetpolymer) in Abhängigkeit der Zeit nach Applikation.

Substanz: Spezifische Nanopartikel = Beispiel D2
 Vergleich = Beispiel C2
 Dosierung: 200 μ Mol Fe/kg Körpergewicht (KGW) (n=3 /Gruppe)
 Zeiten: 4-168 h p. i. (post injectionem)
 Methode: MR-Technik (s. Text zum Beispiel E4)
 Ex-vivo-Modell: (s. Text zum Beispiel E4)

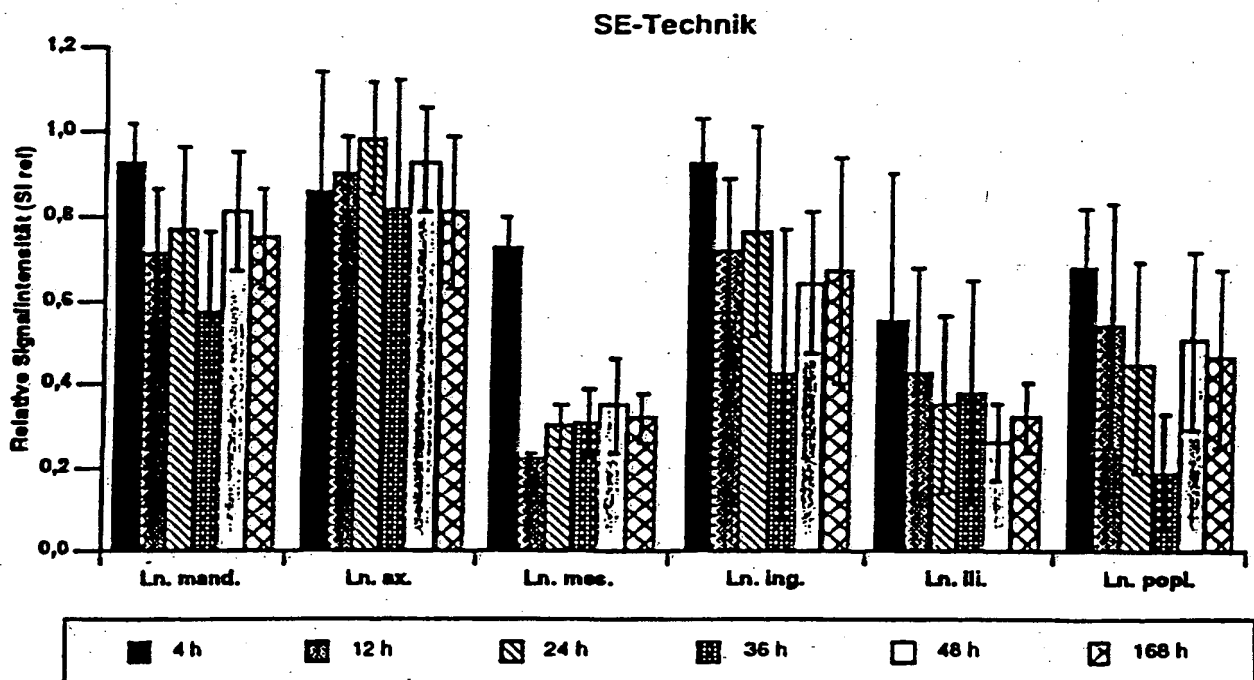


Abb. 18: Unspezifische Ausgangspartikel nach Beispiel C2: Relative Signalintensitäten für SE 2000/15 in verschiedenen Lymphknoten der Ratte in Abhängigkeit der Zeit nach Applikation.

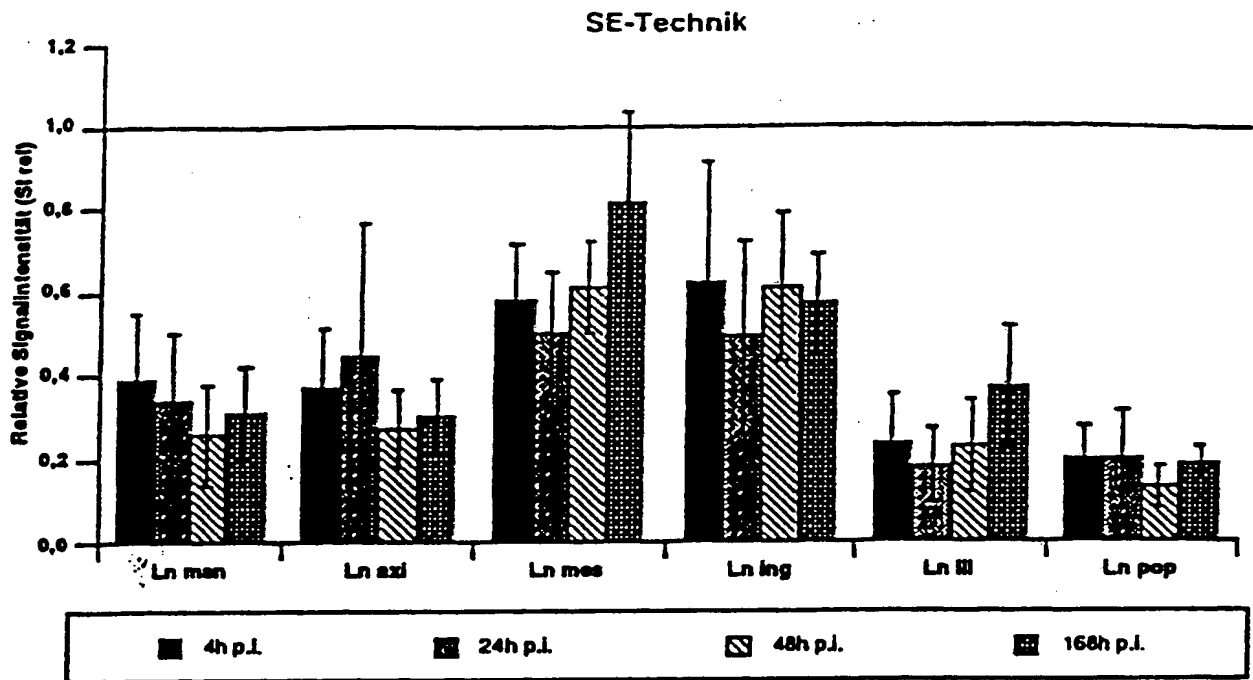


Abb. 19: Spezifische Nanopartikel nach Beispiel C2: Relative Signalintensitäten für SE 2000/15 in verschiedenen Lymphknoten der Ratte in Abhängigkeit der Zeit nach Applikation.

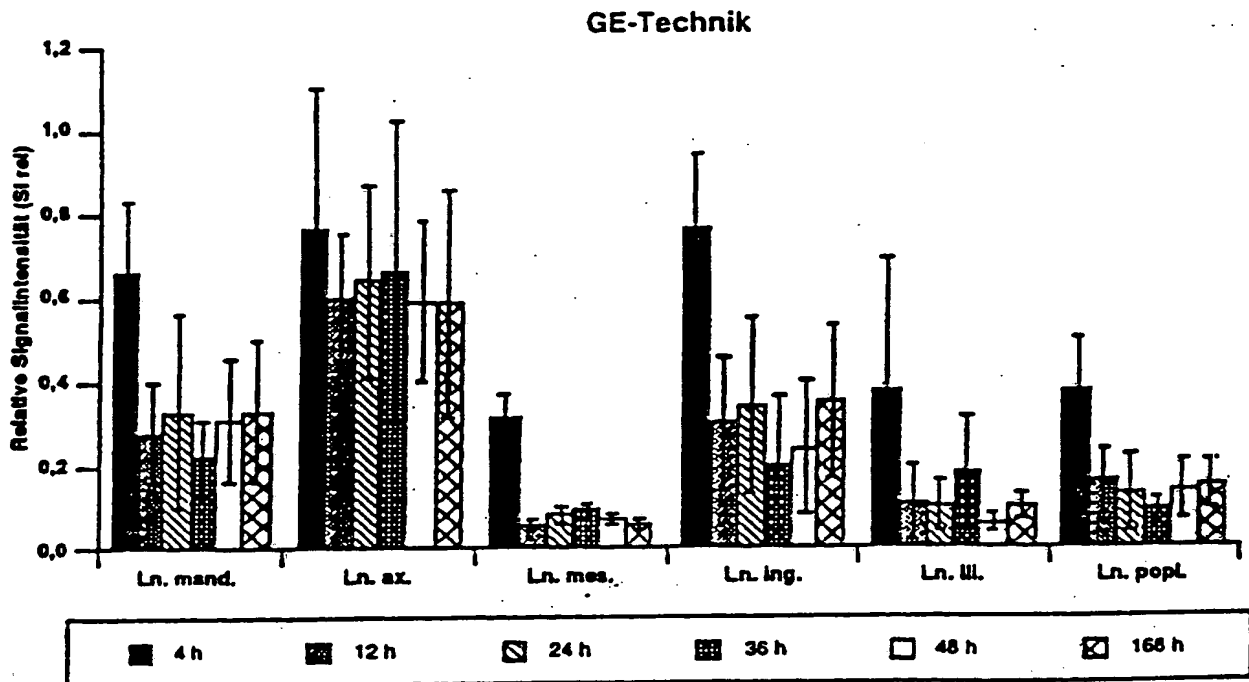


Abb. 20: Unspezifische Ausgangspartikel nach Beispiel C2: Relative Signalintensitäten für GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten der Ratte in Abhängigkeit der Zeit nach Applikation.

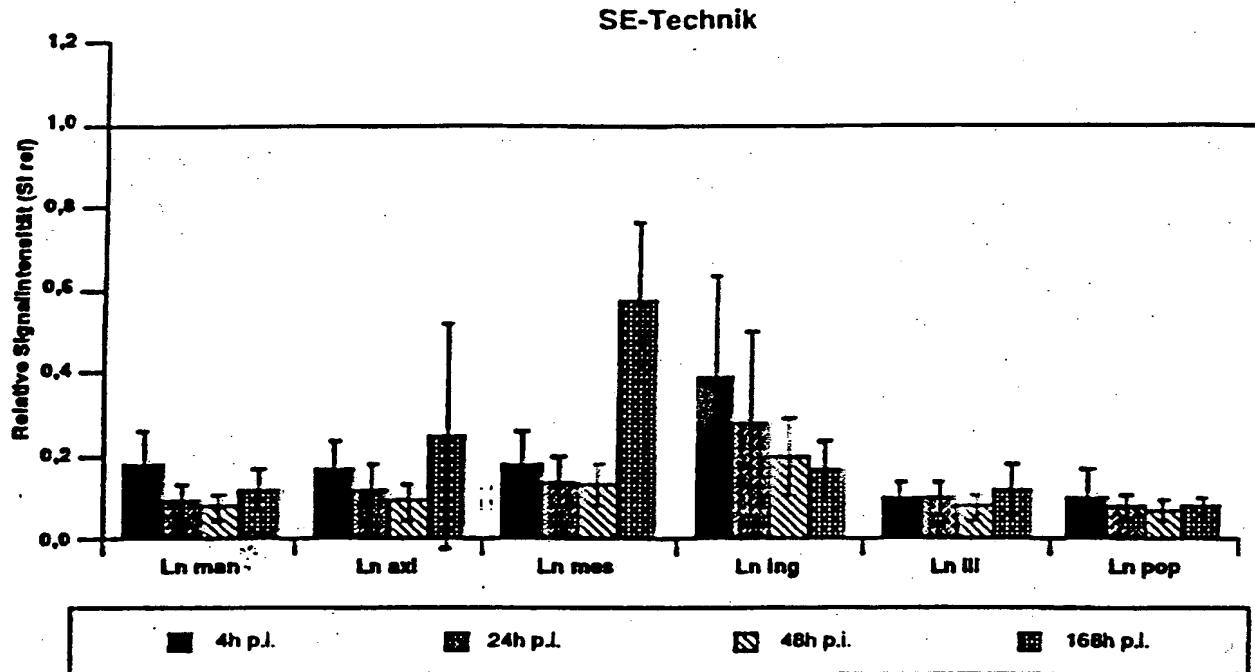


Abb. 21: Spezifische Nanopartikel nach Beispiel C2: Relative Signalintensitäten für GE 135/15/15° in verschiedenen Lymphknoten der Ratte in Abhängigkeit der Zeit nach Applikation.

Die zeitabhängigen MR-tomographischen Untersuchungen zur lymphonodalen Signalreduktion nach intravenöser Applikation der Substanzen zeigen deutlich, daß auch zeitabhängig die unspezifischen Partikel (C2) eine schlechtere Signalreduktion in den Lymphknoten verursacht als die spezifischen Nanopartikel nach Beispiel D2.

Abbildung 22

Kombination mit Hyperthermie (Anwendungsbeispiel E5)

Substanz: Spezifische Nanopartikel (Beispiel D2);
Dosierung: 100 μMol Fe/kg Körpergewicht (KGW) (n=7 /Gruppe)
Zeiten: 24 h p. i. (post injectionem)
Methode: MR-Tomographie in GE-Technik (s. Text zum Beispiel E5)
Hyperthermie-
Modell: Versuchsaufbau (s. Text zum Beispiel E5)

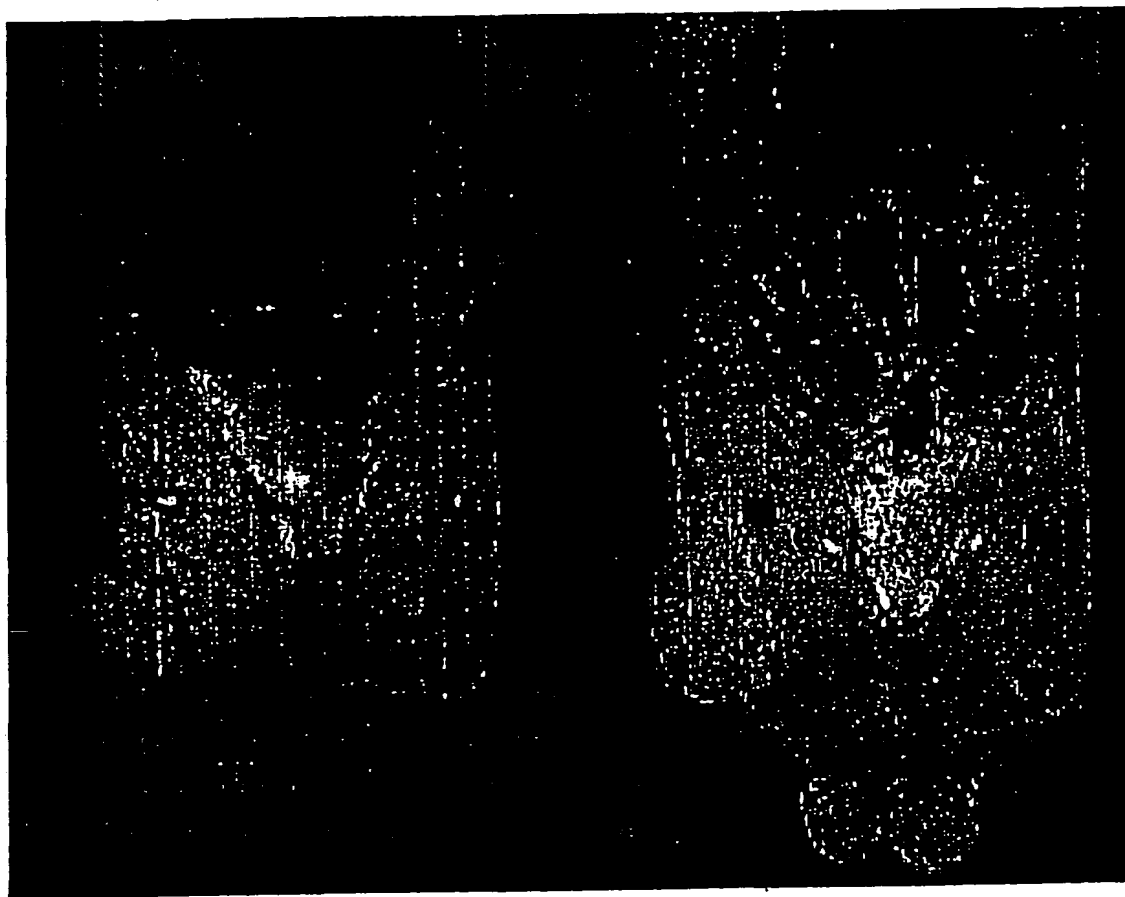


Abb. 22: Beeinflussung der Lymphknoten-anreicherung durch gezielte Applikation von Wärme. In der linken prä-Kontrast Aufnahme sind die poplitealen Lymphknoten nur als helle Flecken zu erahnen. In der rechten Abbildung ist der Einfluß der Wärmebehandlung eindrucksvoll demonstriert. Die linke Seite der Ratte lag auf einer isolierenden Kunststoffplatte und hatte die normale Körpertemperatur während die rechte Seite in einem Wasserbad auf 41,5 - 42,0 °C erwärmt wurde. Die "kalte" Seite zeigt praktisch keine Anreicherung während die erwärmte Seite eine hohe und homogene intralymphonodale Akkumulation der Nanopartikel aufweist. (Nanopartikel nach Beispiel D 2; 100 $\mu\text{Mol/kg}$ KGW; 24 h p. i.; GE 135/15/15)

Abbildungen 23 - 25**MR-Angiographie (Anwendungsbeispiel E6)**

Substanz:	Spezifische Nanopartikel (Beispiel D2) Vergleich Ausgangspartikel nach Beispiel C2
Dosis:	20 $\mu\text{mol Fe / kg i. v.}$
Zeitpunkt:	0-2 h p. i..
MR-Aufnahmetechnik:	Siemens Magnetom 1.5 T, Extremitätenspule, - Dynamik (transversal) mit T1-gewichtete SE Sequenzen (TR: 200 ms, TE: 10 ms), FOV 170 mm, Matrix 256x256, SD: 3 mm; - koronare MIPS von 3D-Flash (TR: 40 (60) ms, TE: 6 ms, FA 60 (40) °) und 3D-FISP-Sequenz (TR: 40 ms, TE: 7 ms, FA 35 °), FOV 240 mm, Matrix 256x256, SD: 17 mm.
MR-Auswertung:	Signalintensitäten in benutzerdefinierten Regions of Interest von Gefäßen (V. cava), Leber, Fett und Muskel. Die Signalintensitäten werden standardisiert auf den Hintergrund kalkuliert.

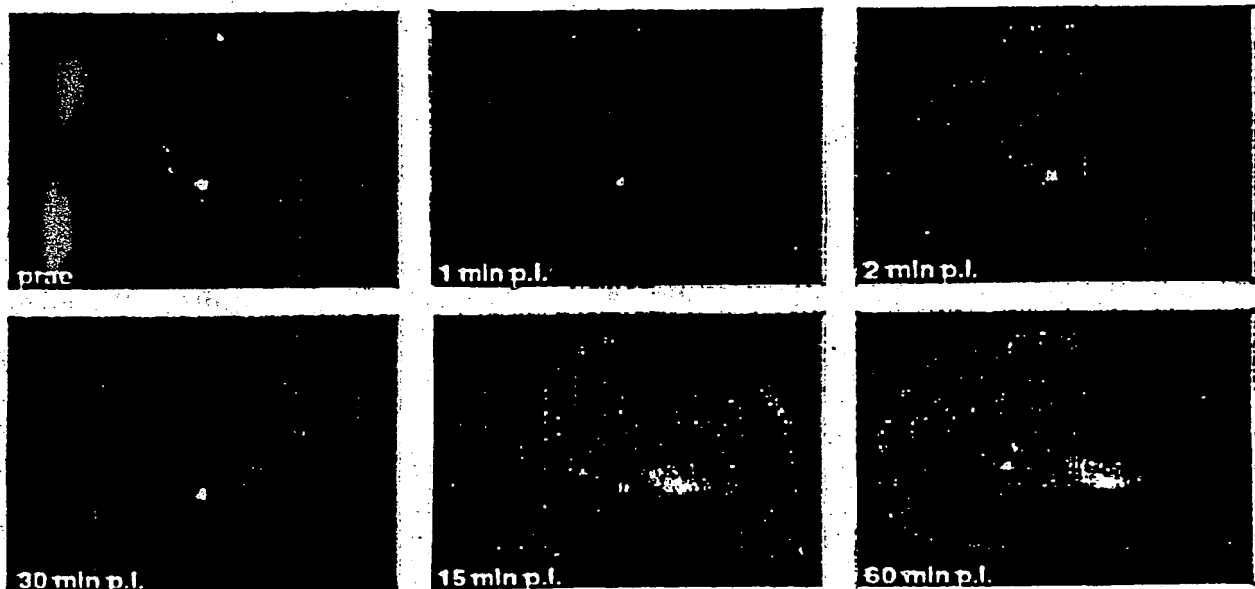


Abb. 23: Transversale Dynamik-Studie des Rattenabdomens mit einer T1-gewichteten SE Sequenz (TR: 200 ms, TE: 10 ms) nach Bolus-Injektion der spezifischen Nanopartikel nach Beispiel D2 (Dosis 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$); deutliches Signal-Enhancement (1 min p.i.) in den intrahepatischen Gefäßen und der V. cava.

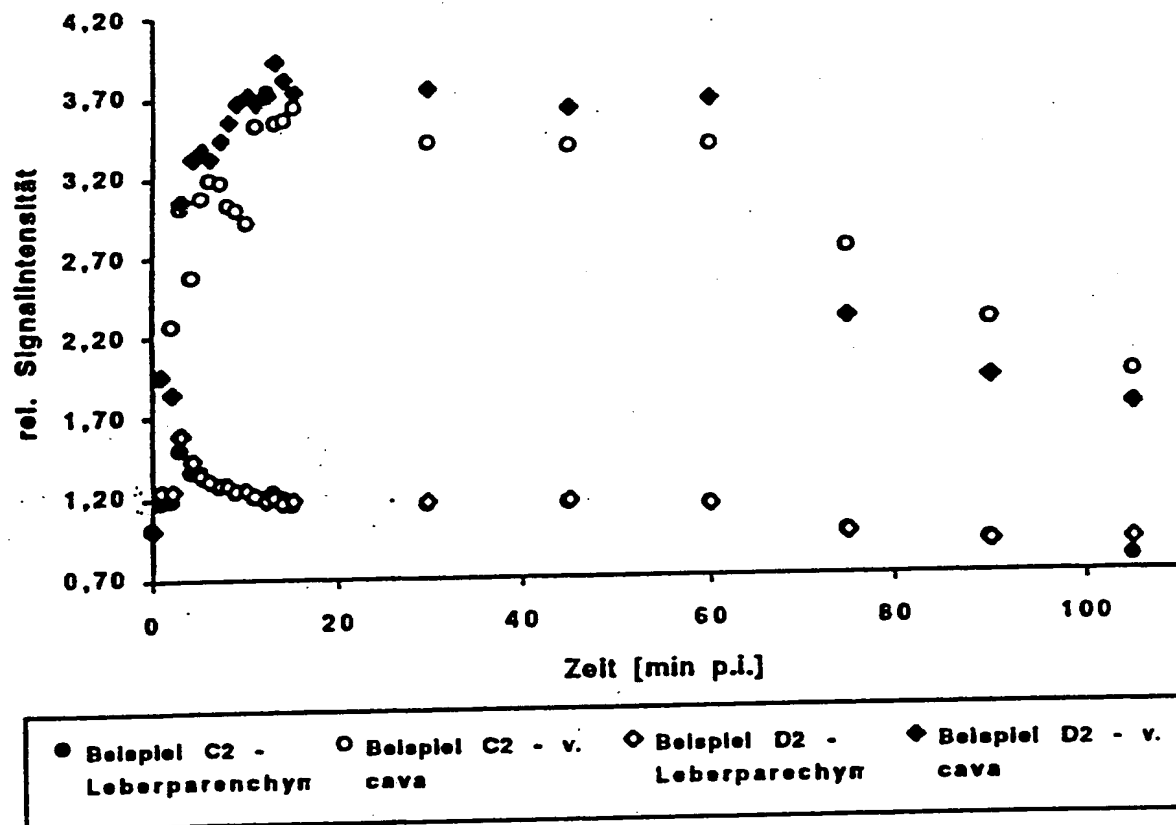


Abb. 24: Vergleich der relativen Signalintensitäten für SE TR/TE = 200ms/10ms im venösen Gefäß und dem Leberparenchym für die spezifischen Nanopartikel nach Beispiel D2 und die Ausgangspartikel nach Beispiel C2; Dosis 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$.

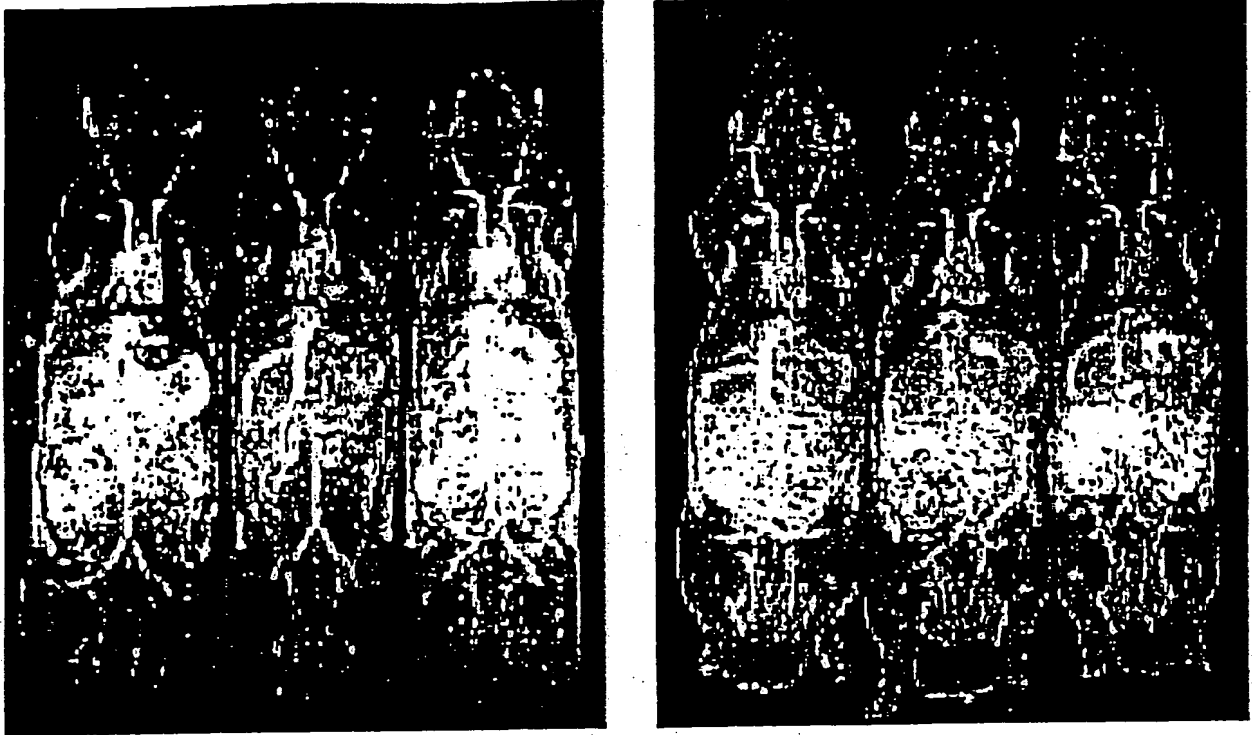


Abb. 25: Koronare MIPS (maximum-intensity projections) von 3D-Flash-Aufnahmen (TR: 40 ms, TE: 6 ms, FA 60 °); Vergleich der spezifischen Partikel nach Beispiel D2 (links) mit den unspezifischen Partikeln nach Beispiel C2 (rechts) - Dosis jeweils 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$.

Abbildungen 26 - 28

Visuelle Darstellung von Lymphknoten (Anwendungsbeispiel E7)

Substanz: Spezifische Nanopartikel (Beispiel D2)

Tiere: Ratte, SPF Han-Wistar, ca. 150 g; Russenkaninchen (Chbb: HM, Thomae GmbH) mit implantiertem VX2-Tumor (Tumorbank des Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg); ca. 2,6 kg. Der Tumor wurde durch Injektion von $3 \cdot 10^6$ lebenden Tumorzellen in die kaudolaterale Oberschenkelmuskulatur implantiert. Die Aufnahme erfolgt 20 Tage nach der Implantation.

Dosierung: Ratte: intravenöse Injektion von 500 μMol Fe/kg Körpergewicht
Kaninchen: Interstitielle Applikation von 20 μMol pro Pfote

Zeiten: Ratte: 1, 4 und 24 h p. i.; Kaninchen: 12 h p. i.

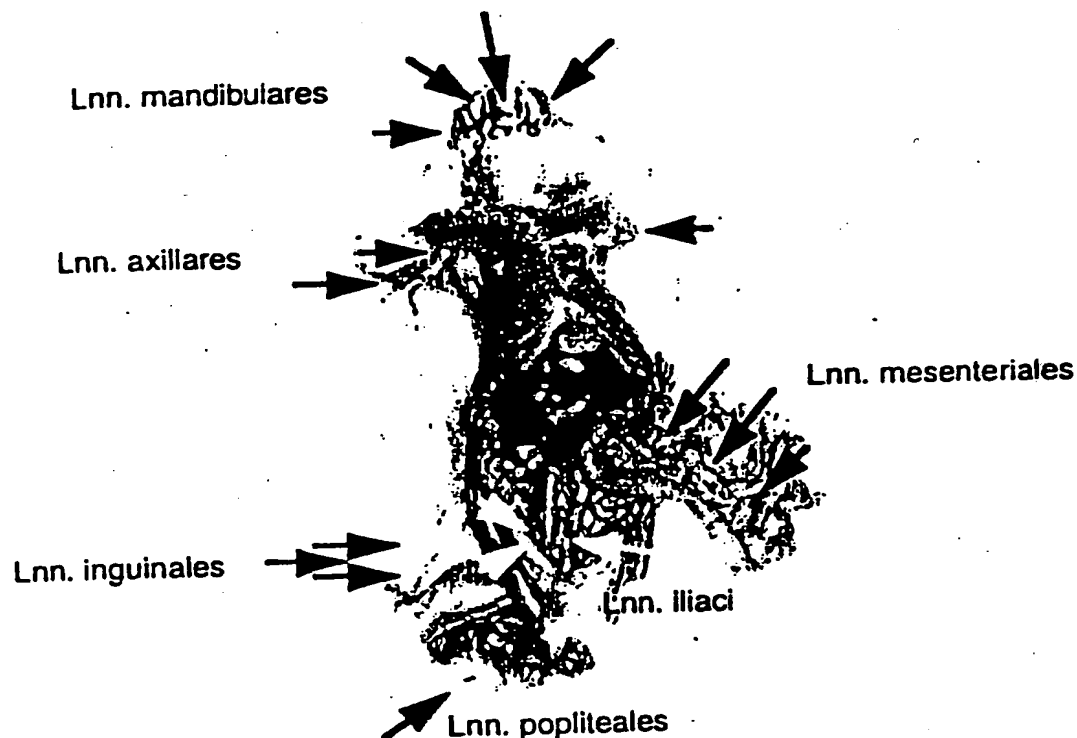


Abb 26: Übersichtsaufnahme der erfindungsgemäßen Nanopartikel (Beispiel D2) zur Demonstration der Eignung als intraoperative Markersubstanz zur Detektion von Lymphknoten an der gesunden Ratte (1 h p. i. ; 500 $\mu\text{Mol/kg}$ Kgw)

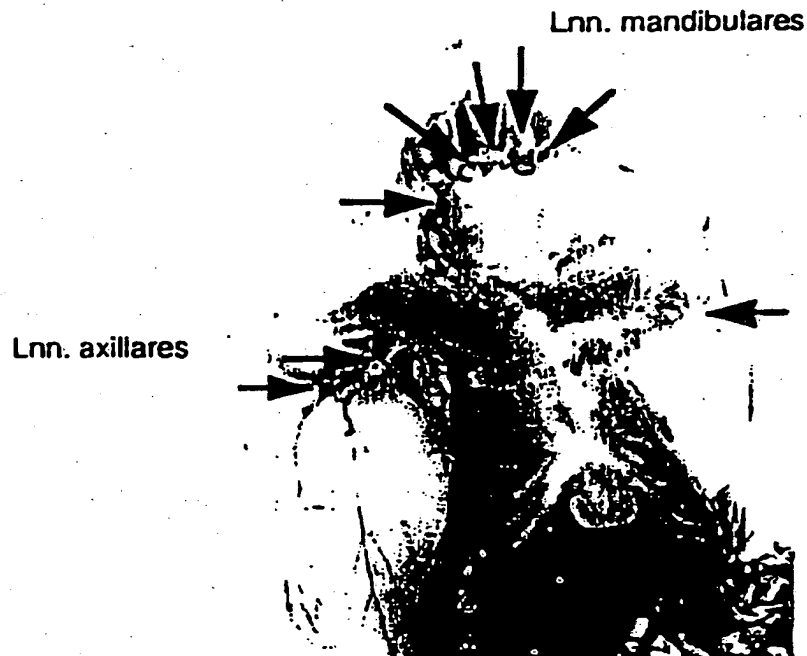


Abb 27: Detailaufnahme der erfindungsgemäßen Nanopartikel (Beispiel D2) zur Demonstration der Eignung als intraoperative Markersubstanz zur Detektion von Lymphknoten an der gesunden Ratte (1 h p. i. ; 500 μ Mol/kg Kgw)

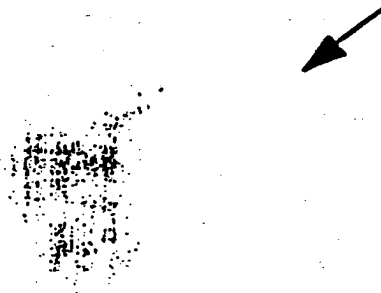


Abb 28: Demonstration von Metastasen (Pfeil) in Lymphknoten durch visuelle Detektion in metastatischen Lymphknoten am Kaninchen (histologisches Präparat). Die Metastasen sind als helle Aussparungen im ansonsten homogen dunkel gefärbten Lymphknoten erkennbar.

Abbildung 29

Zellaufnahme zum Nachweis spezifischer Aufnahme (Anwendungsbeispiel E8)

Nachweis der spezifischen zellulären Aufnahme (Rezeptor-vermittelte Endozytose) bei Nanopartikeln mit Transferrin als Sekundärcoat (Targetpolymer)

Substanz: Spezifische Nanopartikel (Beispiel D6)
Vergleich: Grundsubstanz nach Beispiel C1 (D6 ohne Transferrin)
Dosierung: 0,5 mMol Fe/l Medium
Zeiten: 18 h Inkubation bei 37 °C; 5 % CO₂ - 95 % Luft
Methode: Zellaufnahme (s. Text zum Beispiel E8)

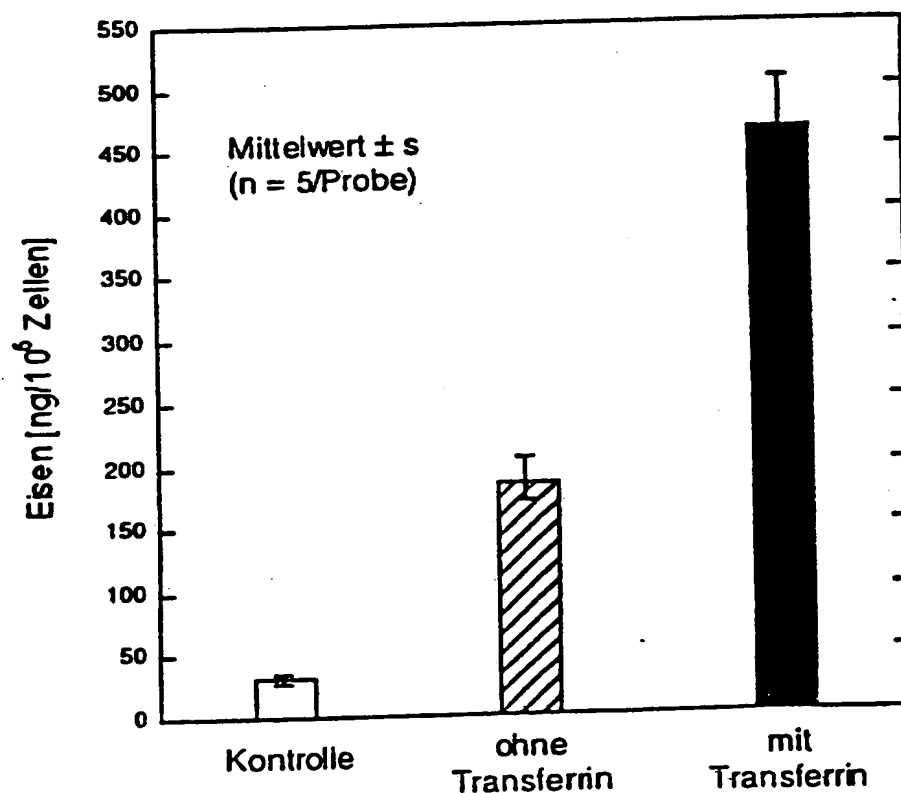


Abb. 29: Zellaufnahme von spezifischen Nanopartikeln (mit Transferrin) im Vergleich zur unspezifischen Kontrolle (Nanopartikel ohne Transferrin). Die NCI-Zellen (humane Myeloma Zelllinie) akkumulieren die spezifischen Partikel mehr als doppelt so stark wie die Kontroll-Partikel.

Abbildung 30 - 32:**Artherosklerose-Imaging am Kaninchen (Anwendungsbeispiel E9)**

Darstellung von atherosklerotischen Plaques am Kaninchen mit Magnetit, das nach dem Desorptions-Adsorptions-Verfahren mit einer Plaque-affinen Peptid gecoatet wurde.

Substanz:	Spezifische Nanopartikel = Beispiel D7
Dosierung:	200 μ Mol Fe/kg Körpergewicht (KGW)
Zeiten:	5 h p. i. (post injectionem)
Methode:	MR-Technik (s. Text zum Beispiel E9)
Ex vivo Modell:	"Ex-vivo-Phantom" (s. Text zum Beispiel E9)

**SE 2000/15****GE 135/15/15°**

Abb. 30: Ex vivo MR-tomographische Darstellung von artherosklerotischer Plaques der Aorta eines Kaninchens mit den spezifischen Nanopartikeln nach Beispiel D7 (Dosis 200 μ mol Fe/kg; Resektion der Aorta 5 h p.i.); links Protonendichte-gewichtete Spin-Echo-Sequenz; rechts T2-gewichtete Gradienten-Echo-Sequenz.

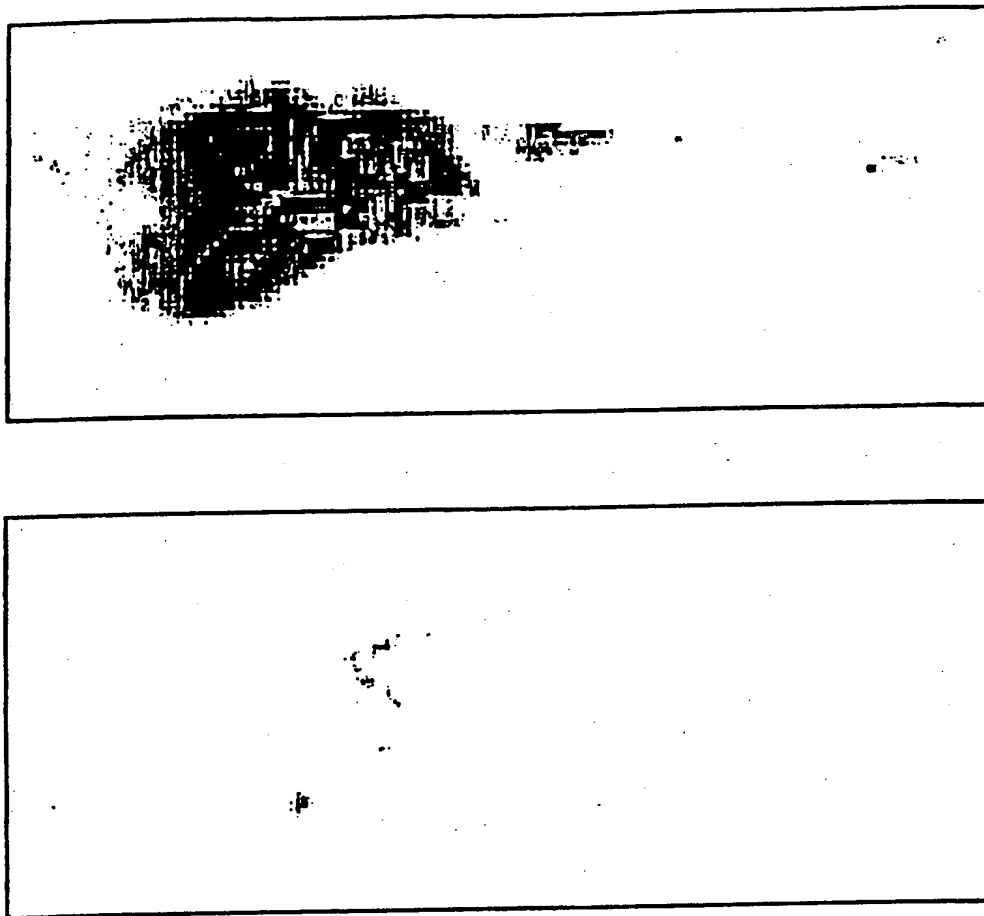


Abb. 31: Histologischer Eisen-Nachweis in der atherosklerotischen Membran der Kaninchen-Aorta mit Berliner-Blau-Färbung (oben). Die Gegenüberstellung mit der MR-tomographischen Aufnahme (GE 135/15/15°, unten) zeigt, daß sich das histologisch nachgewiesene Eisen an den Stellen befindet, an denen im MR-Image das Signal infolge der Anreicherung der Nanopartikel deutlich reduziert ist. Resektion der Aorta 5 h nach intravenöser Applikation von 200 $\mu\text{mol Fe/kg}$ der spezifischen Partikel nach Beispiel D7.



Abb. 32: Histochemische Detektion (Berliner Blau Färbung) der akkumulierten Nanopartikel nach Beispiel D7 in der Aorta eines Watanabe Kaninchens. Die obere Abbildung zeigt eine Übersicht der präparierten Aorta auf dem Agar und der untere Teil demonstriert die gute Korrelation der Eisenfärbung (blaue Granula) mit den schon visuell erkennbaren Plaques im besonders stark veränderten Aortenbogen.

Abbildungen 33 -35:

Tumoranreicherung der Nanopartikel in der tumortragenden Nacktmaus
(Anwendungsbeispiel E10)

Ziel: Es sollte gezeigt werden, daß die erfindungsgemäßen Nanopartikel sich in Tumoren anreichern können. Die Untersuchungen sollen zeigen, daß zum einen die Partikel geeignete Arzneistoffträger für Chemotherapeutika darstellen und zum anderen dokumentieren, daß mit Hilfe der Nanopartikel kontrolliert werden kann, ob die Therapeutika ihren gewünschten Wirkort, also den Tumor, überhaupt erreichen können, so daß hier ein Beispiel für die Kombination von Diagnose und Therapie vorliegt.

- Substanz:** Spezifische Nanopartikel (Beispiel D2);
- Tiere:** Nacktmaus (Swiss nude) mit implantiertem Tumor (n = 5)
(LS 174T, s. c. - Applikation 10 Tage vor Versuchsbeginn)
- Narkose:** Rompun/Ketavet (1:1), ca. 0.5 ml pro kg Körpergewicht i.m.
- Dosierung:** 200 µMol Fe/kg Körpergewicht (KGW)
- Zeiten:** 0 - 120 Minuten und 12 bzw. 24 Stunden nach Applikation.
- Methode:**
- a) MR-Tomographie in SE-Technik
(s. Text zum Beispiel E10)
 - b) Dynamische Aufnahmen: SE-Sequenz mit TR/TE = 300 ms/15 ms
- MR-Auswertung:** Signalintensitäten in benutzerdefinierten Regions of Interest von Tumor, Muskel, Fett und Background. Die relativen Signalintensitäten in den verschiedenen Geweben werden standardisiert auf die Signalintensität im Fett kalkuliert.

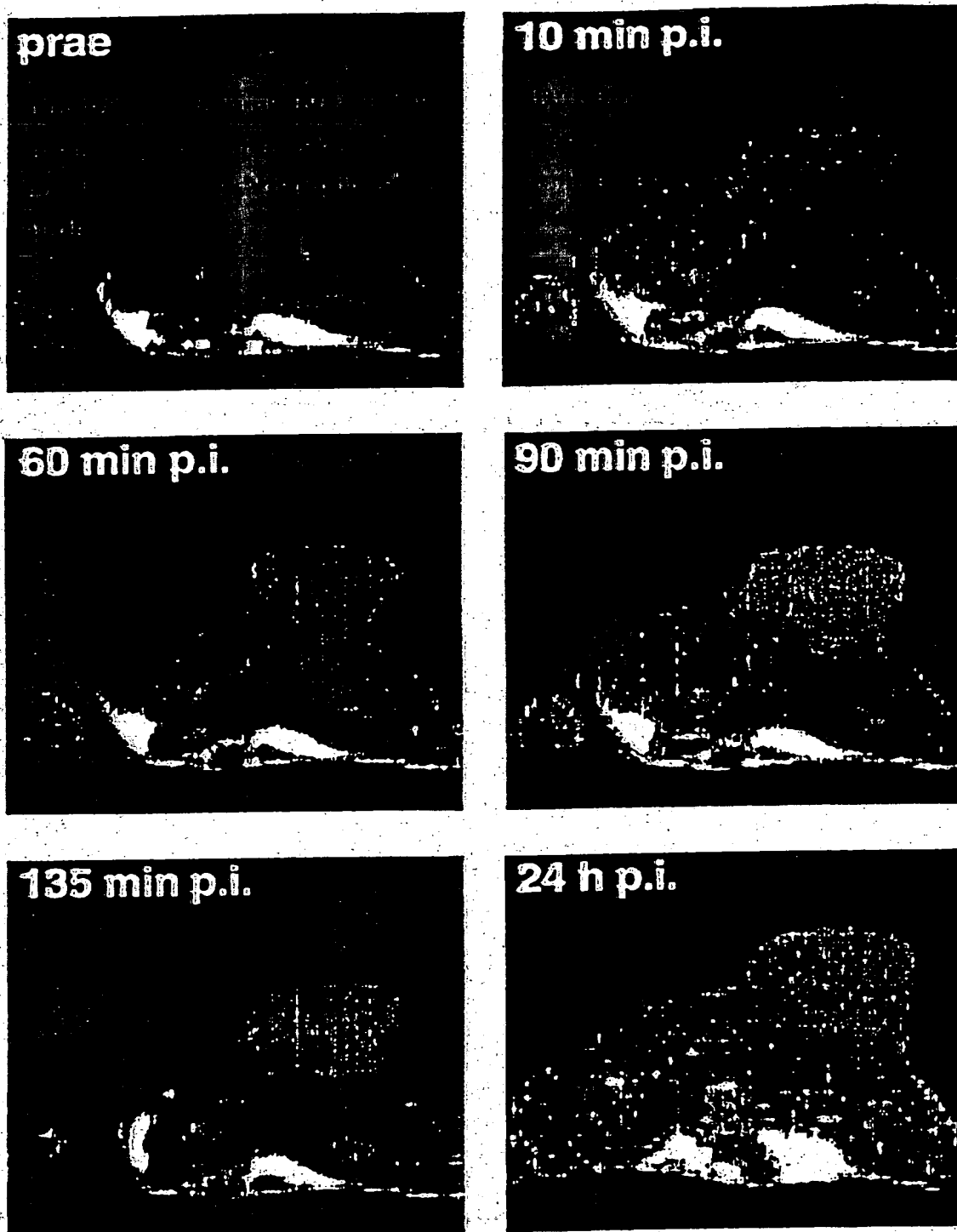


Abb. 33: Transversale T1-gewichtete Spin-Echo Dynamik-Studie (TR: 300 ms, TE: 15 ms) des tumoralen Signalverhaltens nach Bolusinjektion von spezifischen Nanopartikeln nach Beispiel D2 (200 $\mu\text{mol Fe/kg}$); Die Aufnahmen zeigen ein zeitabhängig langsam ansteigendes Signal-Enhancement (Anreicherung) im Tumor mit deutlich zunehmender Abgrenzung der Raumforderung.

30/31

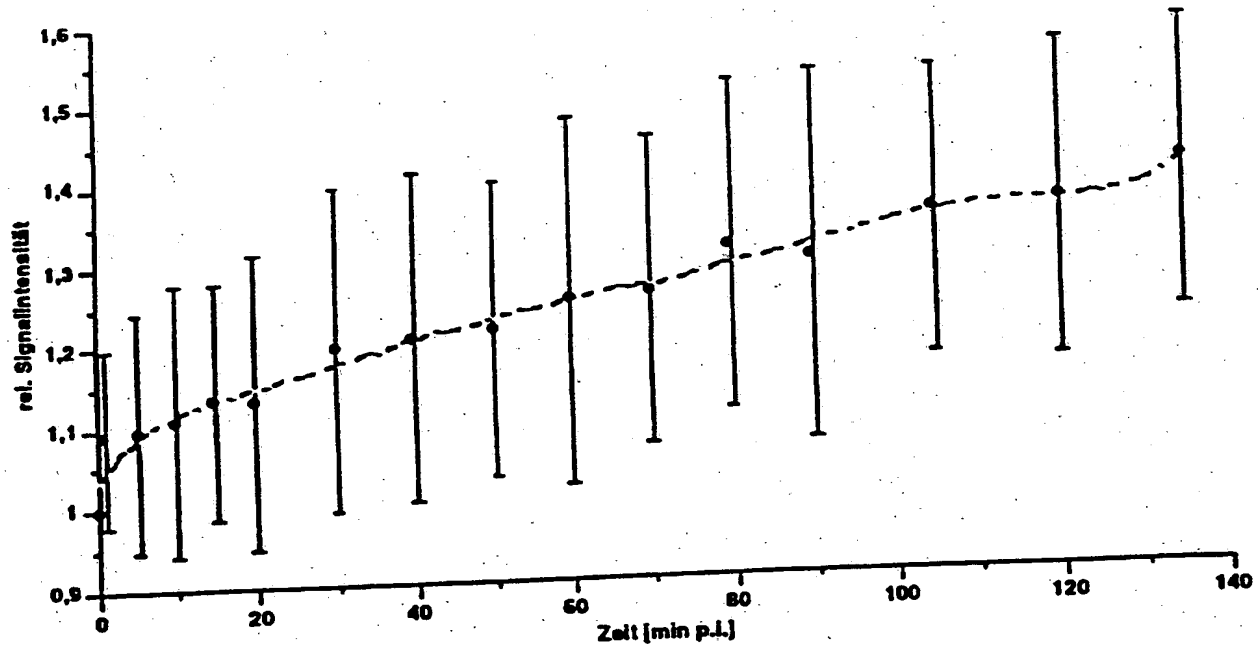


Abb. 34: Verlauf der relativen Signalintensität (Anreicherung) im Tumor.
 Zeitlicher Signalverlauf (Enhancement) für eine Dosis von 200 µM/kg
 Kgw (SE 2000/15)

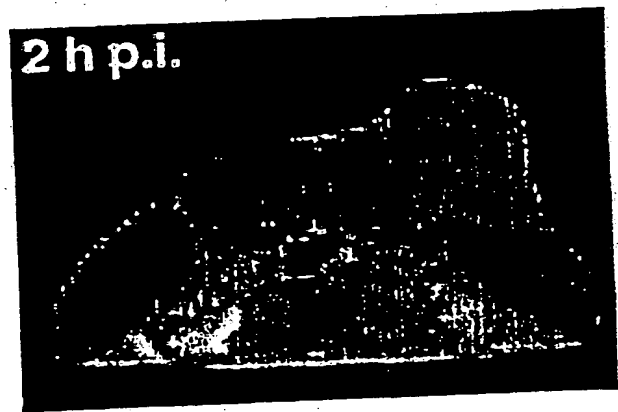


Abb. 35: Zeitabhängige transversale Protonen-Dichte-gewichtete (SE 2000/15, oben) Aufnahmen nach Applikation der Nanopartikel nach Beispiel D2; Dosis jeweils 200 µmol Fe/kg.

In der T1-gewichteten und in der Protonen-Dichte-gewichteten Spin-Echo-Sequenz ist eine zunehmende Akkumulation der Nanopartikel im Tumor mit zeitabhängig linear ansteigendem Signalenhancement festzustellen (Abb. 34; 36). Bis 135 min nach Injektion wird ein 35 - 40 %iges Enhancement beobachtet, was eine deutliche Abgrenzung des Tumors vom gesunden Gewebe erlaubt und die Anreicherung der Nanopartikel bestätigt. Im Gegensatz zu den hier gemachten Beobachtungen wurde bei angiographischen Untersuchungen festgestellt, daß ein durch die Perfusion verursachtes Enhancement im Tumor schon nach spätestens 30 min (p.i.) wieder vollständig abgeklungen ist.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PCT/DE 95/00924A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K49/00 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 516 252 (DIAGNOSTIKFORSCHUNG INST) 2 December 1992 see example 9 see claims ---	1-32
X	WO,A,94 04197 (SINETICA SA) 3 March 1994 see figure 1A ---	1-16
Y	CARBOHYDR. RES., 1991, VOL. 214, NO. 2, PAGES 315-23, RONGVED, PAAL ET AL 'Water-soluble polysaccharides as carriers of paramagnetic contrast agents for magnetic resonance imaging: synthesis and relaxation properties' see "Experimental" see "Discussion" ---	1-32
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 October 1995

Date of mailing of the international search report

02.11.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Dullaart, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 95/00924

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
O,Y	INVEST. RADIOL., 1994, VOL. 29, SUPPL. 2, PAGES S90-S92, MEYER, DOMINIQUE ET AL 'Paramagnetic dextrans as magnetic resonance blood pool tracers' & PROCEEDINGS OF THE CONTRAST MEDIA RESEARCH SYMPOSIUM, 3 - 8 October 1993 SAN ANTONIO, TEXAS, US, see "Materials and Methods" see figures 1.2 ---	1-32
Y	US,A,5 262 176 (PALMACCI STEPHEN ET AL) 16 November 1993 see examples see claims ---	1-32
Y	EP,A,0 150 085 (POLYDEX PHARMA) 31 July 1985 see examples see claims ---	1-32
Y	EP,A,0 184 899 (NYEGAARD & CO AS) 18 June 1986 see examples 24,36 see claims ---	1-32
Y	WO,A,88 00060 (ADVANCED MAGNETICS INCORPORATED) 14 January 1988 see page 24, line 25 - page 25, line 5 see page 38, line 5 - page 39 ---	1-32
P,X	SEMINARS IN LIVER DISEASE, 1995, VOL. 15, NO. 3, PAGE(S) 202-256, MEIJER D.K.F. ET AL 'Targeting of drugs to the liver' see page 219 see page 238 see page 244 ---	1-32
P,Y	EP,A,0 634 174 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 18 January 1995 see examples see claims ---	1-32

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/DE 95/00924

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	<p>DATABASE BIOSIS PREVIEWS HOST: DIALOG BIOSIS number: 98199367, SHLIMAK Y 'Target-specific superparamagnetic contrast agent for magnetic resonance imaging' see abstract & BIOLOGICAL ABSTRACTS/RRM VOL. 047 NO. 005 REF. 073030, & STRAUSS, M. S. (ED.). UNITY IN DIVERSITY;1995 AAAS ANNUAL MEETING AND SCIENCE INNOVATION EXPOSITION: THE 161ST NATIONAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, ATLANTA, GEORGIA, USA; FEBRUARY 16-21, 1995, ABSTRACTS 123, American Association for the Advancement of Science (AAAS): Washington, DC, USA.</p> <p>---</p>	1-32
P,X	<p>US,A,5 395 688 (WANG CHAO-HUEI J ET AL) 7 March 1995 see column 1, line 48 - line 51 see column 3, line 36 - line 41 see claims 6,7,11,13,14</p> <p>-----</p>	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/DE 95/00924

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0516252	02-12-92	DE-A- 4117782	03-12-92
		AU-B- 653220	22-09-94
		AU-A- 1618492	03-12-92
		IL-A- 101929	26-08-94
		JP-A- 7122410	12-05-95
		NZ-A- 242669	28-08-95
		US-A- 5427767	27-06-95
WO-A-9404197	03-03-94	AU-B- 660108	08-06-95
		AU-B- 4705493	15-03-94
		CN-A- 1089470	20-07-94
		EP-A- 0607401	27-07-94
		FI-A- 941677	12-04-94
		JP-T- 7503976	27-04-95
		NO-A- 941311	12-04-94
US-A-5262176	16-11-93	US-A- 4827945	09-05-89
		US-A- 5160726	03-11-92
		US-A- 4770183	13-09-88
		CA-A- 1301063	19-05-92
		EP-A- 0275285	27-07-88
		JP-T- 1500196	26-01-89
		WO-A- 8800060	14-01-88
		US-A- 5055288	08-10-91
		US-A- 5141739	25-08-92
		US-A- 5284646	08-02-94
		US-A- 5248492	28-09-93
		US-A- 5219554	15-06-93
		US-A- 5352432	04-10-94
		US-A- 5342607	30-08-94
		US-A- 5336506	09-08-94
		US-A- 5314679	24-05-94
		EP-A- 0381742	16-08-90
		EP-A- 0670167	06-09-95
		JP-T- 4501218	05-03-92
		WO-A- 9001295	22-02-90
		EP-A- 0514493	25-11-92
		JP-T- 5503538	10-06-93
		WO-A- 9112025	22-08-91
		US-A- 4951675	28-08-90

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 95/00924

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-5262176		US-A- 5069216 US-A- 5102652	03-12-91 07-04-92
EP-A-0150085	31-07-85	US-A- 4788281 CA-A- 1265790 JP-A- 61233001	29-11-88 13-02-90 17-10-86
EP-A-0184899	18-06-86	SE-B- 465908 SE-B- 465909 JP-B- 6078246 JP-A- 61155338 SE-A- 8405500 US-A- 4985233 SE-A- 8405501	18-11-91 18-11-91 05-10-94 15-07-86 02-05-86 15-01-91 02-05-86
WO-A-8800060	14-01-88	US-A- 4827945 US-A- 4770183 CA-A- 1301063 EP-A- 0275285 JP-T- 1500196 US-A- 5055288 US-A- 5141739 US-A- 5262176 US-A- 5284646 US-A- 5248492 US-A- 5219554 US-A- 5352432 US-A- 5342607 US-A- 5336506 US-A- 5314679 US-A- 4951675 US-A- 5069216 US-A- 5102652	09-05-89 13-09-88 19-05-92 27-07-88 26-01-89 08-10-91 25-08-92 16-11-93 08-02-94 28-09-93 15-06-93 04-10-94 30-08-94 09-08-94 24-05-94 28-08-90 03-12-91 07-04-92
EP-A-0634174	18-01-95	CA-A- 2127900 JP-A- 7076524	14-01-95 20-03-95
US-A-5395688	07-03-95	AU-B- 634631 AU-B- 7174691 CA-A- 2046894	25-02-93 18-07-91 15-06-91

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern/ al Application No

PCT/DE 95/00924

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-5395688		EP-A- 0463144	02-01-92
		JP-T- 4503968	16-07-92
		WO-A- 9109141	27-06-91
		AU-B- 2796689	01-06-89
		DE-A- 3836475	03-05-89
		DE-D- 3852299	12-01-95
		DE-T- 3852299	20-07-95
		EP-A- 0344270	06-12-89
		JP-T- 2501753	14-06-90
		WO-A- 8904373	18-05-89
		US-A- 5091206	25-02-92
		US-A- 5283079	01-02-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 95/00924

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K49/00 A61K47/48

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 516 252 (DIAGNOSTIKFORSCHUNG INST) 2.Dezember 1992 siehe Beispiel 9 siehe Ansprüche ---	1-32
X	WO,A,94 04197 (SINETICA SA) 3.März 1994 siehe Abbildung 1A ---	1-16
Y	CARBOHYDR. RES., 1991, VOL. 214, NO. 2, PAGES 315-23, RONGVED, PAAL ET AL 'Water-soluble polysaccharides as carriers of paramagnetic contrast agents for magnetic resonance imaging: synthesis and relaxation properties' siehe "Experimental" siehe "Discussion" ---	1-32
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- * "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- * "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- * "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- * "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- * "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24.Oktober 1995

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

02.11.95

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Dullaart, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interi uales Aktenzeichen

PCT/DE 95/00924

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
O,Y	INVEST. RADIOL., 1994, VOL. 29, SUPPL. 2, PAGES S90-S92, MEYER, DOMINIQUE ET AL 'Paramagnetic dextrans as magnetic resonance blood pool tracers' & PROCEEDINGS OF THE CONTRAST MEDIA RESEARCH SYMPOSIUM, 3. - 8.Oktober 1993 SAN ANTONIO, TEXAS, US, siehe "Materials and Methods" siehe Abbildungen 1,2 ---	1-32
Y	US,A,5 262 176 (PALMACCI STEPHEN ET AL) 16.November 1993 siehe Beispiele siehe Ansprüche ---	1-32
Y	EP,A,0 150 085 (POLYDEX PHARMA) 31.Juli 1985 siehe Beispiele siehe Ansprüche ---	1-32
Y	EP,A,0 184 899 (NYEGAARD & CO AS) 18.Juni 1986 siehe Beispiele 24,36 siehe Ansprüche ---	1-32
Y	WO,A,88 00060 (ADVANCED MAGNETICS INCORPORATED) 14.Januar 1988 siehe Seite 24, Zeile 25 - Seite 25, Zeile 5 siehe Seite 38, Zeile 5 - Seite 39 ---	1-32
P,X	SEMINARS IN LIVER DISEASE, 1995, VOL. 15, NO. 3, PAGE(S) 202-256, MEIJER D.K.F. ET AL 'Targeting of drugs to the liver' siehe Seite 219 siehe Seite 238 siehe Seite 244 ---	1-32
P,Y	EP,A,0 634 174 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 18.Januar 1995 siehe Beispiele siehe Ansprüche ---	1-32
	-/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,Y	<p>DATABASE BIOSIS PREVIEWS HOST: DIALOG BIOSIS number: 98199367, SHLIMAK Y 'Target-specific superparamagnetic contrast agent for magnetic resonance imaging' siehe Zusammenfassung & BIOLOGICAL ABSTRACTS/RRM VOL. 047 NO. 005 REF. 073030, & STRAUSS, M. S. (ED.). UNITY IN DIVERSITY;1995 AAAS ANNUAL MEETING AND SCIENCE INNOVATION EXPOSITION: THE 161ST NATIONAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, ATLANTA, GEORGIA, USA, FEBRUARY 16-21, 1995, ABSTRACTS 123, American Association for the Advancement of Science (AAAS): Washington, DC, USA.</p> <p>---</p>	1-32
P,X	<p>US,A,5 395 688 (WANG CHAO-HUEI J ET AL) 7.März 1995 siehe Spalte 1, Zeile 48 - Zeile 51 siehe Spalte 3, Zeile 36 - Zeile 41 siehe Ansprüche 6,7,11,13,14</p> <p>-----</p>	1-32

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internales Aktenzeichen

PCT/DE 95/00924

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0516252	02-12-92	DE-A- 4117782	03-12-92
		AU-B- 653220	22-09-94
		AU-A- 1618492	03-12-92
		IL-A- 101929	26-08-94
		JP-A- 7122410	12-05-95
		NZ-A- 242669	28-08-95
		US-A- 5427767	27-06-95
WO-A-9404197	03-03-94	AU-B- 660108	08-06-95
		AU-B- 4705493	15-03-94
		CN-A- 1089470	20-07-94
		EP-A- 0607401	27-07-94
		FI-A- 941677	12-04-94
		JP-T- 7503976	27-04-95
		NO-A- 941311	12-04-94
US-A-5262176	16-11-93	US-A- 4827945	09-05-89
		US-A- 5160726	03-11-92
		US-A- 4770183	13-09-88
		CA-A- 1301063	19-05-92
		EP-A- 0275285	27-07-88
		JP-T- 1500196	26-01-89
		WO-A- 8800060	14-01-88
		US-A- 5055288	08-10-91
		US-A- 5141739	25-08-92
		US-A- 5284646	08-02-94
		US-A- 5248492	28-09-93
		US-A- 5219554	15-06-93
		US-A- 5352432	04-10-94
		US-A- 5342607	30-08-94
		US-A- 5336506	09-08-94
		US-A- 5314679	24-05-94
		EP-A- 0381742	16-08-90
		EP-A- 0670167	06-09-95
		JP-T- 4501218	05-03-92
		WO-A- 9001295	22-02-90
		EP-A- 0514493	25-11-92
		JP-T- 5503538	10-06-93
		WO-A- 9112025	22-08-91
		US-A- 4951675	28-08-90

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 95/00924

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A-5262176		US-A- 5069216 US-A- 5102652	03-12-91 07-04-92
EP-A-0150085	31-07-85	US-A- 4788281 CA-A- 1265790 JP-A- 61233001	29-11-88 13-02-90 17-10-86
EP-A-0184899	18-06-86	SE-B- 465908 SE-B- 465909 JP-B- 6078246 JP-A- 61155338 SE-A- 8405500 US-A- 4985233 SE-A- 8405501	18-11-91 18-11-91 05-10-94 15-07-86 02-05-86 15-01-91 02-05-86
WO-A-8800060	14-01-88	US-A- 4827945 US-A- 4770183 CA-A- 1301063 EP-A- 0275285 JP-T- 1500196 US-A- 5055288 US-A- 5141739 US-A- 5262176 US-A- 5284646 US-A- 5248492 US-A- 5219554 US-A- 5352432 US-A- 5342607 US-A- 5336506 US-A- 5314679 US-A- 4951675 US-A- 5069216 US-A- 5102652	09-05-89 13-09-88 19-05-92 27-07-88 26-01-89 08-10-91 25-08-92 16-11-93 08-02-94 28-09-93 15-06-93 04-10-94 30-08-94 09-08-94 24-05-94 28-08-90 03-12-91 07-04-92
EP-A-0634174	18-01-95	CA-A- 2127900 JP-A- 7076524	14-01-95 20-03-95
US-A-5395688	07-03-95	AU-B- 634631 AU-B- 7174691 CA-A- 2046894	25-02-93 18-07-91 15-06-91

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 95/00924

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A-5395688		EP-A- 0463144	02-01-92
		JP-T- 4503968	16-07-92
		WO-A- 9109141	27-06-91
		AU-B- 2796689	01-06-89
		DE-A- 3836475	03-05-89
		DE-D- 3852299	12-01-95
		DE-T- 3852299	20-07-95
		EP-A- 0344270	06-12-89
		JP-T- 2501753	14-06-90
		WO-A- 8904373	18-05-89
		US-A- 5091206	25-02-92
		US-A- 5283079	01-02-94

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)